

**CHARAKTERISIERUNG DER ANTIKÖRPER
IN SERUM UND LIQUOR
BEI SENDAIVIRUS - INFEKTIONEN
VON RATTE UND MAUS**

MICHAEL SIGMUND

1988

Disbui. München

1988



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Max-Planck-Institut für Biochemie
in Martinsried bei München
Abteilung Virusforschung

Leitung: Prof. Dr. Dr. Peter Hans Hofschneider

vorgelegt über das

Institut für Medizinische Mikrobiologie, Infektions-
und Seuchenmedizin der Tierärztlichen Fakultät der
Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. Anton Mayr

CHARAKTERISIERUNG DER ANTIKÖRPER IN SERUM UND LIQUOR BEI SENDAIVIRUS-INFEKTIONEN VON RATTE UND MAUS

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen
Doktorwürde der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Michael Sigmund
aus Germering

München 1988

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. M. Rüsse

Referent: Prof. Dr. Dr.h.c.mult. A. Mayr

Korreferent: Prof. Dr. M. Ruf

Tag der Promotion: 29. Juli 1988

GLIEDERUNG

	Seite
1. EINLEITUNG	
1.1 Die klinisch apparente Virusinfektion	1
1.2 Die klinisch inapparente Virusinfektion	2
1.3 Medizinische Bedeutung der Paramyxoviridae	3
1.3.1 Genus Paramyxovirus	3
1.3.2 Genus Morbillivirus	4
1.3.3 Genus Pneumovirus	5
1.4 Reaktionen des Organismus auf Virusinfektionen	6
1.4.1 Unspezifische Abwehrmechanismen	6
1.4.1.1 Phagozytose	6
1.4.1.2 Die spontane, zellvermittelte Zytotoxizität	7
1.4.1.3 Das Interferonsystem	7
1.4.2 Spezifische Abwehrmechanismen (Immunität)	8
1.4.2.1 Humorale Immunität	8
1.4.2.2 Zelluläre Immunität	10
1.4.2.3 Immunantwort im ZNS	11
1.4.3 Möglichkeiten der Persistenzentstehung	12
1.4.3.1 Virale Mechanismen	12
1.4.3.1.1 Ts-Mutanten	12
1.4.3.1.2 DI-Partikel	13
1.4.3.2 Effekte des Immunsystems	13
1.4.4 Persistierende Viren als Risikofaktoren der Immunpathologie	14
1.5 Paramyxoviren	16
1.5.1 Morphologie	16
1.5.2 Virusproteine und Funktion	16
1.5.3 Virusreplikation	17
1.5.3.1 Adsorption, Penetration, Uncoating	17
1.5.3.2 Eklipse, Maturation	17
1.6 Infektion von Ratten und Mäusen mit Sendaivirus D52 und 6/94	18
1.6.1 Das Sendaivirus 6/94	18
1.6.2 Intranasale Infektion	19
1.6.2.1 Pathologie	19
1.6.2.2 Verbreitung infektiöser Viren im Organismus	20

1.6.2.3	Immunantwort	20
1.6.3	Intracerebrale Infektion	20
1.6.3.1	Pathologie	20
1.6.3.2	Immunantwort	21
1.7	Systematische Untersuchung virusproteinspezifischer Immunglobulintiter in Serum und Liquor	22
1.8	Problemstellung	23
2.	MATERIAL UND METHODEN	
2.1	Material	24
2.2	Puffer und Lösungen	27
2.3	Methoden	32
2.3.1	Virusvermehrung im Hühnerei	32
2.3.2	Virusreinigung	32
2.3.3	Virologische Tests	33
2.3.3.1	Hämagglutinationstest (HA-Test)	33
2.3.3.2	Kulturinfektionsdosistest (KID)	33
2.3.3.3	Hämagglutinationshemmungstest (HAH)	33
2.3.4	Gelelektrophoretische Methoden	34
2.3.4.1	Analytische SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	34
2.3.4.2	Präperative SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	35
2.3.4.3	Phast-System (PHARMACIA)	35
2.3.4.3.1	Trenneinheit	35
2.3.4.3.2	Entwickler-Einheit	36
2.3.4.3.3	Herstellung von Gelen für das Phast-System	36
2.3.4.4	Proteinfärbung im Gel	36
2.3.4.4.1	Coomassie Blue Färbung	36
2.3.4.4.2	Silberfärbung	37
2.3.4.4.3	Dokumentation	37
2.3.4.5	Elektroelution	38
2.3.4.6	Proteinbestimmung nach Schaffner-Weißmann	38
2.3.5	Immunologische Methoden	39
2.3.5.1	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	39
2.3.5.2	Immunoblot	40
2.3.5.2.1	Elektrotransfer	40
2.3.5.2.2	Immunoperoxidasefärbung	40
2.3.5.2.3	Unspezifische Proteinfärbung auf Nitrozellulose	41

2.3.6	Versuchstiere	42
2.3.6.1	Narkose	42
2.3.6.2	Serumgewinnung	42
2.3.6.3	Liquorgewinnung	43
2.3.6.4	Intranasale Infektion	43
2.3.6.5	Intracerebrale Infektion	43

3. ERGEBNISSE

3.1	Infektion der Tiere und Symptomatik der Erkrankung	44
3.1.1	Herstellung des Infektionsmaterials	44
3.1.2	Klinische Symptomatik nach intranasaler Infektion von Ratten und Mäusen	44
3.1.3	Methodik und klinische Symptomatik der intracerebralen Infektion von Mäusen	45
3.1.4	Untersuchung der Seren auf infektiöse Viren	46
3.2	Antikörper in Serum und Liquor	48
3.2.1	Liquor- und Serumgewinnung	48
3.2.2	IgG- und IgA-Titer gegen Gesamtvirusprotein im Serum D52- und 6/94-Virus infizierter Mäuse	48
3.2.3	Entwicklung eines Nachweissystems für Antikörper auf der Basis des Western-Blots	53
3.2.3.1	Prinzip des Mini-Western-Blots	53
3.2.3.2	Eigenschaften des Mini-Western-Blots	55
3.2.3.3	Abschätzung der relativen Nachweissgrenze für virusspezifische Antikörper	59
3.2.4	Virusproteinspezifische Immunglobuline nachgewiesen durch den Mini-Western-Blot	60
3.2.4.1	Untersuchung von C-129 Mäusen	61
3.2.4.1.1	IgG-Titer im Serum nach intranasaler 6/94-Virus Infektion	61
3.2.4.1.2	IgA-Titer im Serum nach intranasaler 6/94-Virus Infektion	63
3.2.4.1.3	IgG-Titer im Serum nach intranasaler D52-Virus Infektion	64
3.2.4.1.4	IgG-Titer im Liquor nach intranasaler Infektion	65
3.2.4.1.5	IgG-Titer im Serum und Liquor nach intracerebraler 6/94-Virus Infektion	66

3.2.4.1.6	IgG-Titer im Serum nach intracerebraler 6/94-Virus Infektion am PID 736	68
3.2.4.2	Untersuchung von Lewis-Ratten	70
3.2.4.2.1	Serum IgG-Titer nach intranasaler D52-Virus Infektion	70
3.2.4.2.2	Serum IgG-Titer nach intranasaler 6/94-Virus Infektion	71
3.2.4.2.3	Serum IgG-Titer nach intracerebraler D52-Virus Infektion	73
3.2.4.2.4	Serum IgG-Titer nach intracerebraler 6/94-Virus Infektion	74
3.2.4.2.5	IgGs im Liquor	76
3.2.5	Hämagglutinationshemmende Antikörper in Rattenserum	79
3.2.6	Antikörpertiter gegen die einzelnen Virusproteine ermittelt durch den ELISA	82
3.2.6.1	Proteinreinigung	82
3.2.6.2	Reinheit der isolierten Proteine	83
3.2.6.3	IgG-Titer gegen einzelne Virusproteine im Serum von Ratten	84
3.2.6.4	IgG-Titer im Liquor von Ratten	91
3.2.6.5	Slot-Blot der viralen Proteine HN, NP und F	92
3.2.6.6	Vergleich zwischen dem Western-Blot auf Nitrozellulose und Immobilon	95

4. DISKUSSION

4.1	Die Mini-Western-Blot Methode	100
4.2	Infektion und Krankheitsverlauf	102
4.3	Antikörper gegen die einzelnen viralen Proteine im Verlauf der Infektion	103
4.3.1	Zeitlicher Verlauf der Antikörpertiter im Serum	103
4.3.2	Antikörper gegen das NP-Protein	104
4.3.3	Antikörper gegen das P-Protein	105
4.3.4	Antikörper gegen das HN- und F-Protein	105
4.3.5	Antikörper gegen das M-Protein	106
4.4	Dauer der Antikörperproduktion	107
4.5	Virusspezifische Antikörpertiter im Liquor	108
4.6	Sendaiviren im Tiermodell	110

5.	ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY	112
6.	LITERATUR	114
7.	ABKÜRZUNGEN	127

1. EINLEITUNG

Bei allen Arten von Lebewesen gibt es Viren als Zellparasiten und Erreger von Krankheiten. Die Entwicklung dieser Gebilde aus Nukleinsäuren und Proteinen dürfte daher eng mit der Entwicklungsgeschichte der Pflanzen und Tiere verknüpft sein, läßt sich aber nicht mehr genau zurückverfolgen.

Die ältesten beschriebenen, durch Viren verursachten Seuchen dürften wohl die Pockenepidemien in China, 1500 v.Ch. sein. Doch erst 1769 gelang durch Edward Jenner erstmals die Immunisierung von Menschen gegen eine Viruserkrankung, nämlich die Pocken. Der Nachweis von Viren als Krankheitserreger gelang wieder ein Jahrhundert später Iwanowski im Jahre 1892, indem er zeigte, daß der Saft mosaikkranker Tabakpflanzen auch nach Filtration durch bakteriendichte Filter infektiös blieb. Löffler und Frosch konnten das gleiche für den Erreger der Maul- und Klauenseuche 1898 zeigen (Bachmann et al., 1984). Obwohl das Wissen über Viren heute weit fortgeschritten ist, geben sie immer noch große Rätsel auf.

1.1 Die klinisch apparente Virusinfektion

Die klinisch apparente, also Symptome hervorrufoende Infektion, kann entweder akut, subakut oder chronisch sein. In jedem Fall kommt es durch diese Virusinfektion auch zu einer erkennbaren Krankheit. Normalerweise beginnt eine Virusinfektion mit der Ansiedlung und Vermehrung der Erreger an der Eintrittspforte bzw. in primär affinen Organen. Nach der Generalisation über eine Virämie kommt es zur Organmanifestation mit ihren spezifischen Symptomen. Je nach der Abwehrsituation des Wirtes und der Virulenz des Erregers kommt es zum Tod des Wirtes, oder zur Genesung. Die akute und subakute Infektion stellt dabei eine vorübergehende, zeitlich begrenzte Infektion dar, nach der das Virus aus dem Körper eliminiert wird. Eine chronische Infektion entsteht, wenn ein nur schwach virulentes Virus vorliegt, oder der Organismus nicht in der Lage ist, sich ausreichend zu wehren. Auch die chronische Infektion ist zeitlich meist begrenzt: Die Auseinandersetzung endet entweder für den

Wirt tödlich, oder der Erreger kann nach längerer Zeit doch noch eliminiert werden. Teilweise kann aber auch eine zeitlich unbegrenzte chronische Infektion auftreten, z.B. wenn die Viren zellgebunden, intrazellulär verbleiben und so von der Abwehr des Organismus nicht erfaßt werden. Ein solcher Infektionsverlauf ist auch möglich, wenn sich ein schwach virulenter Erreger in immunkompetenten Zellen vermehrt und dadurch einer endgültigen Elimination entgeht (Bachmann et al., 1984).

1.2 Die klinisch inapparente Virusinfektion

Virusinfektionen, die keine klinischen Symptome hervorrufen, können unterteilt werden in subklinische, latente, okkulte (maskierte), tolerierte Infektion (Bachmann et al., 1984) und schließlich, zumindest in ihrer Anfangsphase, die sogenannte "slow virus infection" (Sigurdsson, 1954).

Die subklinische Infektion wird durch ein virulentes Virus verursacht, das aber durch eine gute und schnelle Immunreaktion nicht zum Krankheitsausbruch führt und bald aus dem Körper eliminiert wird.

Eine latente Infektion wird durch eine schwache Immunreaktion möglich, wobei sich ein labiles Gleichgewicht zwischen Virusvermehrung und Immunabwehr ausbildet.

Bei einer okkulten Infektion verbleibt die virale genetische Information ohne klinische Symptomatik und ohne feststellbare Proteinexpression im Wirt. Ein typischer Fall für eine okkulte Virusinfektion ist die Transformation der befallenen Zelle, die sich erst lange Zeit später in einer Tumorentwicklung zeigen kann.

Die tolerierte Infektion schließlich kann sich nur bei fehlender Immunantwort etablieren, so z.B. bei kongenitalen Infektionen oder Infektionen noch sehr junger Individuen, bei denen sich das Immunsystem noch in der Toleranzphase befindet.

Den Begriff "slow virus infection" hat erstmals Sigurdson 1954 benutzt. Solche Infektionen sind gekennzeichnet durch eine lange Inkubationszeit, die sich über Monate und Jahre hinzieht. Der Erreger vermehrt sich nur sehr langsam und der Krankheitsverlauf ist dadurch äußerst protrahiert.

Unabhängig von der klinischen Ausprägung der Virusinfektion kann noch der Begriff der persistierenden Infektion für alle Wirts-Virus Beziehungen verwendet werden, bei denen die Viren bei geringer Produktivität längere Zeit im Organismus verbleiben.

1.3 Medizinische Bedeutung der Paramyxoviridae

Die Familie der Paramyxoviridae ist in die drei Genera Paramyxovirus, Morbillivirus und Pneumovirus gegliedert (Kingsbury et al., 1978).

1.3.1 Genus Paramyxovirus

Das Genus Paramyxovirus setzt sich aus dem Parainfluenzavirus Typ 1 auch Sendavirus genannt (Hauptwirt Maus), Parainfluenzavirus Typ 2 (Appel & Percy, 1970), Typ 3 (Yates, 1982), Typ 4 (Jackson & Muldon, 1973), dem Mumpsvirus (Mensch), dem Newcastle-Virus (Geflügel) und mindestens 9 weiteren Typen von aviären Paramyxoviren zusammen (Alexander, 1980).

Parainfluenzaviren werden mit lokal an den Schleimhäuten des Respirationstraktes auftretenden Erkrankungen assoziiert. Im allgemeinen verlaufen Parainfluenzavirus-Infektionen klinisch inapparent, ohne über eine Virämie eine Allgemeininfektion auszulösen. Sie können aber im Zusammenhang mit endogenen und exogenen Stressoren oder bakteriellen Sekundärinfektionen auch zu schweren Erkrankungen des Respirationstraktes führen. Alle Parainfluenzaviren haben hämagglutinierende Eigenschaften für Erythrozyten verschiedener Spezies und besitzen zudem das Enzym Neuraminidase.

Eine der bekanntesten durch Paramyxoviren hervorgerufenen Krankheiten ist die beim Menschen vorkommende, meist fieberhafte Mumpsinfektion, die mit bevorzugter Manifestation in der Parotis und den Glandulae submaxillares und sublingualis abläuft. Im Verlauf der Infektion kann es aber auch zum Befall anderer Drüsen und insbesondere auch des ZNS, in Form von Enzephalitiden und Meningo-Enzephalitiden kommen, die oft Dauerschäden, wie z.B. Taubheit hinterlassen können (Bachmann et al., 1984). Im Hamster-Tiermodell konnte gezeigt werden, daß aus humaner Muttermilch isolierte neuroadaptierte Virusstämme sowohl nach intracere-

braler, wie auch nach intraperitonealer Infektion, Neuronen infizieren und schwere Meningo-Enzephalitiden hervorrufen können. Aus der Abdominalhöhle dringen die Erreger über infizierte mononukleäre Zellen in den Liquor cerebrospinalis vor und können sich von dort, nach Vermehrung im Chorioidalendothel, im ganzen ZNS ausbreiten (Wolinsky & Stroop, 1978).

Newcastle Disease ist eine hochkontagiöse Infektionskrankheit, die unter Hühnervögeln zu schweren Verlusten führt und damit von großer wirtschaftlicher Bedeutung ist. Die akute Verlaufsform ist durch septikämische Allgemeinsymptome, erschwerte Atmung sowie starke Durchfälle gekennzeichnet, während die heute häufiger zu beobachtende chronische Form meist von zentralnervösen Symptomen begleitet wird (Lancaster, 1973).

1.3.2 Genus Morbillivirus

Masernvirus (Mensch), Staupevirus (Hund), Rinderpestvirus (Rind) (Imagawa, 1968) und das Peste des petits ruminants-Virus (Schaf, Ziege) (Gibbs et al., 1979) werden als Morbilliviren zusammengefaßt.

Die charakteristischen Symptome der Staupe sind Fieber, Nasen und Augenausfluß, Katarrhe der Schleimhäute des Respirations- und Digestionstrakts und eine Leukopenie. In einem Teil der Fälle kommt es zu zentralnervösen Symptomen während der akuten Infektion oder einige Wochen später. Die Veränderungen im Gehirn reichen von milden entzündlichen Erscheinungen bis zu schweren, disseminierten Meningo-Enzephalomyelitiden mit Demyelinisierung. Die als Spätfolge von Staupeerkrankungen auftretenden ZNS-Störungen (Old dog encephalitis) sind wohl auf Autoimmunreaktionen zurückzuführen. Es wurde nachgewiesen, daß die Anlagerung von Staupeantigen an die Oberfläche von Lymphozyten die Produktion von Antilymphozyten-Antikörpern induziert (Krakowka et al., 1981). Diese Antikörper wirken gegen lymphozytäre Elemente zytotoxisch und können deshalb zu Autoimmunerkrankungen führen. Unter experimentellen Bedingungen sind Hamster und Mäuse für das Staupevirus empfänglich und entwickeln ZNS-Erkrankungen.

Nahe verwandt mit dem Staupevirus sind das Masernvirus und das Rinderpestvirus. Rinderpestinfektionen kommen bei allen Wiederkäuern vor

und haben in der Vergangenheit schon häufig verheerende Seuchenzüge verursacht. Im 18. Jahrhundert sollen in Europa ca. 200 Millionen Rinder diesem Virus zum Opfer gefallen sein. Heute (seit 1930) ist Europa rinderpestfrei und nur in Afrika und Asien ist die Seuche noch enzootisch verbreitet (Bachmann et al., 1984).

Masern hingegen sind noch immer weltweit verbreitet. Die in der Regel gutartig verlaufende Krankheit hat als charakteristische Symptome Fieber, Übelkeit, Kopfschmerzen, Konjunktivitis, Pharyngitis und pathognomonisch für die Erkrankung sind die auftretenden Exantheme. Neurologische Komplikationen treten in etwa 0,1% der gemeldeten Masernfälle ein, wobei sich leichte Fälle, die durch Benommenheit, Schläfrigkeit und Fieber gekennzeichnet sind, schnell wieder normalisieren, schwere Enzephalitiden, die mit Krämpfen, Delirien, Konvulsionen und komatösen Zuständen einhergehen, oft zum Tode führen. Als äußerst seltene Spätfolge einer Maserninfektion (Häufigkeit: Ein Fall auf 100.000 - 1 Million Maserninfektionen) kann es zur subakuten, sklerotisierenden Panenzephalitis (SSPE) kommen, einer entzündlichen, progressiven, langsam verlaufenden Erkrankung des ZNS, die Kinder und Jugendliche betrifft. Das erste Stadium dieser Krankheit, die sich über Monate bis Jahre hinziehen kann, ist der schleichende Verfall des geistigen Leistungsvermögens. Danach kommt es zu Hyperkinesen und Tonussteigerungen der Muskulatur, bis im Endstadium schließlich eine immer stärker werdende Dezerebrationsstarre in Erscheinung tritt. Die SSPE verläuft immer tödlich (Bachmann et al., 1984).

1.3.3 Genus Pneumovirus

Zum Genus Pneumovirus gehören das Respiratory-Syncytial-Virus (Mensch, Rind) und das Pneumovirus (Maus).

Das Respiratory-Syncytial-Virus ist ein häufiger Primärerreger von Broncheolitiden und Pneumonien bei Kleinkindern, wobei für schwere Verlaufsformen immunpathologische Vorgänge verantwortlich gemacht werden (Chanock et al., 1970). Da dem Virus eine Hämagglutinin- und Neuraminidaseaktivität fehlt und der Durchmesser des Nukleokapsids mit 12-15nm etwas geringer als bei Morbilli- und Parainfluenzaviren ist, wird es zum Genus Pneumovirus gezählt.

Viele Paramyxoviridae haben also eine Affinität zu Geweben des ZNS. Daß solche ZNS Infektionen über eine persistierende Verlaufsform zum Tod des Wirtes führen können zeigt das Beispiel der SSPE.

1.4 Reaktionen des Organismus auf Virusinfektionen

Man unterscheidet prinzipiell zwischen unspezifischen Abwehrmechanismen und spezifischen.

Unspezifische Abwehrmechanismen, wie z.B. die Phagozytose, die spontane zellvermittelte Zytotoxizität und das Interferonsystem funktionieren ohne vorhergegangenen Antigenkontakt und können daher auch nicht gegen bestimmte Antigene gerichtet sein.

Die spezifischen Abwehrmechanismen, wie Antikörper und spezifische zytotoxische T-Zellen, müssen zunächst durch Antigene geprägt werden. Nach dieser Prägung sind diese Mechanismen gegen spezifische Antigene gerichtet.

Bei den meisten Virusinfektionen ist das Abwehrsystem in der Lage, die Krankheitserreger aus dem Körper zu eliminieren. Jedoch beeinflussen viele unterschiedliche Faktoren die Stärke der Immunantwort auf Virusinfektionen, so z.B. das Alter des Wirtes, Umfang und Ort der Virusvermehrung und die Antigenität der viralen Proteine.

1.4.1 Unspezifische Abwehrmechanismen

1.4.1.1 Phagozytose

Vor der virusspezifischen Immunantwort stehen unspezifische Abwehrmechanismen. Die zur Phagozytose befähigten Zellen des lymphoretikulären Gewebes werden als Mikro- und Makrophagen bezeichnet. Zu den Makrophagen zählen die Histiozyten des Bindegewebes, die Sinuszellen von Milz, Leber und Knochenmark, die Retikulumzellen von Milz, Lymphknoten, Knochenmark und Thymus, die Monozyten des Blutes und die Mikroglia des ZNS. Mikrophagen sind die polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten und die eosinophilen Leukozyten. Durch Chemotaxis nähern sich die Phagozyten den aufzunehmenden Partikeln, wobei C5a, ein Fragment eines

Komplementfaktors, ein besonders stark chemotaktisch wirkendes Molekül ist. Um Antigene zu erkennen besitzen Phagozyten auf ihrer Oberfläche Rezeptoren, mit deren Hilfe sie sich an eine ganze Reihe von fremden Partikeln anlagern können, wobei die Anlagerung sehr viel stärker ist, wenn das Antigen durch den C3b Komplement-Faktor opsoniert ist. Nach erfolgter Anlagerung werden die Fremdkörper in sogenannten Phagosomen gefangen und mit Hilfe von Lysosomen zerstört (Roitt, 1984). Viele Viren können jedoch durch phago-lysosomale Mechanismen nicht zerstört werden, und bedienen sich sogar der Phagozyten als Verbreitungsvehikel (Verini & Lief, 1979).

1.4.1.2 Die spontane, zellvermittelte Zytotoxizität

Sie ermöglicht dem Organismus, als "fremd" erkannte Zellen zu lysieren, ohne vorher antigenetisch stimuliert worden zu sein. Die hierfür verantwortlichen Zellen, die sich hauptsächlich in Blut, Milz und Lymphknoten finden, werden als "natural killer cells" (NK-Zellen) bezeichnet. Diese NK-Zellen können auf der Oberfläche virusinfizierter Zellen Änderungen erkennen, sich anlagern und die Zielzellen lysieren. Aktiviert werden die "natural killer cells" durch Interferone, die deren zytotoxische Aktivität noch unterstützen (Bachmann et al., 1984).

1.4.1.3 Das Interferonsystem

Interferone werden von infizierten Zellen, manchmal auch von uninfizierten Lymphozyten gebildet. Neben ihrer Wirkung auf die Aktivität von NK-Zellen induzieren Interferone einen Zustand erhöhter Virusresistenz in noch nicht infizierten Zellen des Nachbargewebes, aktivieren das lymphoretikuläre Bindegewebe, die Phagozytose und die Bildung von Prostaglandinen. Im Laufe einer Infektion werden Interferone sehr früh gebildet und stellen oft die erste Abwehrlinie gegen viele Viren dar. Man unterscheidet bei Mensch und Maus drei Gruppen von Interferonen (IFN): IFN alpha, IFN beta und IFN gamma. Die Alpha-Interferon-Klasse besteht aus einer Reihe von Subtypen und außerdem existieren auch beträchtliche Speziesunterschiede (Roitt, 1984).

Interferon, das von virusinfizierten Zellen freigesetzt wird, bindet an Rezeptoren der Nachbarzellen und bewirkt in ihnen einen antiviralen

Zustand, der den Infektionsherd abkapseln helfen soll. Dabei wird wahrscheinlich die Virusproteinsynthese oder die Synthese der Nukleinsäuren gehemmt. Am effektivsten wird die Interferonproduktion durch Polyribonukleotide und besonders durch doppelsträngige RNA angeregt. Eine Reihe von Zelloberflächenantigenen werden in Anwesenheit von Interferonen entweder stärker oder schwächer exprimiert. Zum Beispiel exprimieren in Gegenwart von Interferon-alpha und-beta Lymphozyten vermehrt HLA-A und -B-Antigene.

Der Nachweis antiviraler Aktivität in vivo konnte durch Experimente geführt werden, bei denen Mäuse, die mit Antikörpern gegen murines Interferon behandelt worden waren, bereits durch eine hundertmal niedrigere Virusdosis getötet wurden, als Kontrolltiere ohne Antikörperbehandlung (Sehgal et al., 1982).

1.4.2 Spezifische Abwehrmechanismen (Immunität)

Unter Immunität versteht man die antigenspezifische Abwehrkraft eines Organismus. Man unterscheidet die sogenannte sterile Immunität, bei der die spezifischen Abwehrmöglichkeiten nach Neutralisation des Erregers weiter fortbestehen, und die Infektionsimmunität, die dadurch charakterisiert ist, daß sie nur so lange anhält, wie noch vermehrungsfähige Erreger im Organismus vorhanden sind. Weiterhin differenziert man zwischen der aktiven Immunität, die nach Antigenkontakt vom Körper selbst aufgebaut wird, und einer passiven Immunität, die dadurch entsteht, daß Immunglobuline von einem Individuum auf ein anderes übertragen werden (Bachmann et al., 1984).

1.4.2.1 Humorale Immunität

Das humorale Immunsystem beruht auf der Bildung von Immunglobulinen durch Plasmazellen. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe von Glykoproteinen, die bei den meisten höher entwickelten Säugetieren in 5 Klassen, nämlich IgG, IgA, IgM, IgE und IgD eingeteilt werden. Sie unterscheiden sich voneinander in Größe, elektrischer Ladung, Zusammensetzung der Aminosäuren und ihrem Kohlenhydrat-Anteil. Die Grundstruktur der Immunglobuline besteht aus zwei identischen leichten

Polypeptidketten und zwei identischen schweren Polypeptidketten, die durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die Klasse und Subklasse eines Immunglobulins wird dabei durch den Typ ihrer schweren Ketten festgelegt. IgG ist das Hauptimmunglobulin im Serum und der wichtigste Antikörper der sekundären Immunantwort. IgM ist ein pentameres Molekül, stellt etwa 10% des gesamten Immunglobulinpools und ist der vorherrschende "frühe" Antikörper. IgA kommt hauptsächlich in seromukösen Sekreten vor, wo es meist in der dimeren Form vorliegt. IgD macht weniger als 1% der Plasmaimmunglobuline aus, wobei über seine genaue biologische Aktivität noch nichts bekannt ist. IgE schließlich findet sich im Serum nur in Spuren und spielt eine Rolle bei der Immunität gegen Parasiten und in Zusammenhang mit Überempfindlichkeitsreaktionen vom Soforttyp.

Eine wichtige Effektorfunktion von Immunglobulinen ist die Aktivierung des Komplementsystems. An Antigen gebunden können IgM und IgG das Komplementsystem effektiv aktivieren, während IgA, IgD und IgE in dieser Hinsicht wirkungslos sind (Roitt, 1984).

Direkt können Immunglobuline nur an extrazelluläre Antigene bzw. Viren binden und hierdurch die Interaktion zwischen viralen Proteinen und der Zelle beeinträchtigen. Prinzipiell können Antikörper Viren auf drei verschiedene Arten neutralisieren: Indem sie die Virusoberfläche abdecken wird die Phagozytose beschleunigt; durch Blockade bestimmter viraler Oberflächenantigene können sie den Kontakt der Viren zu Zellen verhindern; schließlich sind Antikörper mit Hilfe des Komplements in der Lage die Lipidhülle von einigen Viren direkt zu lysieren. Immunglobuline gegen bestimmte Oberflächenantigene, sogenannte "critical sites", z.B. Hämagglutinin bei Influenzaviren, bewirken eine effektivere Neutralisation als Antikörper gegen sogenannte "non critical sites", wie z.B. die Neuraminidase (Roitt, 1984). Antikörper zusammen mit Komplement (C1-C9) können Zellen, die virale Antigene tragen, zerstören und auch die Lipidmembran mancher Viren direkt schädigen. Antikörper alleine sind jedoch nicht ausreichend, um Viren völlig aus dem Organismus zu eliminieren, wie der folgende Befund zeigt: Die Übertragung von Antikörpern gegen Influenza auf infizierte Nacktmäuse führt nicht zur Elimination der Viren, obwohl die Freisetzung infektiöser Viren (shedding) unterdrückt wird. Andererseits können Mäuse, die

agammaglobulinämisch gemacht werden, und daher keine Antikörper produzieren, eine Infektion überstehen und auch immun bleiben. Das zeigt die Bedeutung der T-Zell vermittelten Immunität (McMichael et al., 1983).

Die Antikörperantwort gegen die meisten viralen Antigene ist von T-Zellen abhängig, die als Helferzellen die Synthese von Immunglobulinen durch Plasmazellen stimulieren, oder die Produktion von IgM auf IgG umschalten. In Abwesenheit von T-Zellen erscheinen nur Antikörper der IgM Klasse (Roit, 1984). Athymische, nackte Mäuse, die keine T-Zellen besitzen, produzieren nach Infektion mit Herpes Simplex-Viren, SV40 und verschiedenen Paramyxoviren keine neutralisierenden Antikörper. Nach Infektion mit Entero- und Togaviren werden zwar Antikörper produziert, jedoch nur kurzfristig und nur Immunglobuline der Klasse M (Burns, 1975).

1.4.2.2 Zelluläre Immunität

Träger der zellulären Immunität sind die T-Lymphozyten, die sich wie die B-Lymphozyten aus Stammzellen des Knochenmarks entwickeln und ihre Reifung zu immunkompetenten Zellen im Thymus erfahren. Aktivierte T-Zellen differenzieren sich in einige Subpopulationen: Helfer-Zellen, die den B-Zellen bei der Erkennung der Antigene helfen, Supressorzellen, die eine zentrale Überwachungsfunktion innerhalb des Immunsystems ausüben, zytotoxische, antigenspezifische Killerzellen, die eingedrungene Erreger oder antigentragende Zellen direkt lysieren und Effektorzellen, die viele für die Ausbildung einer Immunität notwendige Mediatoren bilden. Spezifische zytotoxische T-Zellen können virusinfizierte Zellen direkt, ohne Hilfe von Antikörpern lysieren. Lymphokine, die von T-Zellen sezerniert werden, können weitere T-Zellen rekrutieren oder sensitivieren, Makrophagen aktivieren und die B-Zellaktivität entweder behindern oder fördern (Bachmann et al., 1984). Durch die aufgezählten Effekte leistet die zellvermittelte Immunität ihren Beitrag zur Abwehr von Virusinfektionen. Im Zusammenspiel mit den unspezifischen Abwehrmechanismen und der humoralen Immunität führt dies im Regelfall zur Elimination der viralen Krankheitserreger aus dem Organismus.

Die zellvermittelte Immunität ist jedoch manchmal sehr zweischneidig, wie der folgende Befund zeigt: Mäuse, die noch in der immuntoleranten

Phase mit lymphozytären Choriomeningitis Virus infiziert werden, oder zur Zeit der Infektion immunsupprimiert werden, entwickeln kaum Krankheitssymptome. Die Viren persistieren in den Zellen, ohne diese stark zu schädigen. Transferiert man nun auf diese persistent infizierten Mäuse sensitivierte T-Lymphozyten, so entwickeln die Tiere eine akute Enzephalitis und sterben (Cole et al., 1971).

1.4.2.3 Immunantwort im ZNS

Das ZNS ist relativ isoliert von der systemischen Immunantwort. Proteine und Zellen des Blutes sind durch die anatomische Barriere der Blut-Hirn-Schranke, die durch die tight junctions der Kapillarendothelien und die Epithelzellen des Plexus chorioideus gebildet wird, weitgehend aus dem ZNS ausgeschlossen. Die in sehr geringem Maß im gesunden Liquor vorhandenen Immunglobuline kommen nur aus dem Blut (Frick & Scheid-Seydel, 1958), wobei IgG und IgA ca. 0,2% bis 0,4% der Serumtiter erreicht und IgM noch deutlich niedriger liegt. Während einer Entzündung kann die Blut-Liquor-Schranke durchlässiger werden und die Antikörpertiter im Liquor können ansteigen. Es können aber auch B-Zellen ins ZNS einwandern, was frühestens eine Woche nach dem Auftreten der Entzündung im Laufe einer viralen Enzephalitis geschieht, und diese können nach Differenzierung in Plasmazellen im ZNS Immunglobuline synthetisieren. Diese intrathekale Synthese von Antikörpern spiegelt sich wieder in einer Veränderung des Verhältnisses AK-Titer Serum/ AK-Titer Liquor, durch das Auftauchen von oligoklonalen IgG-Banden im Liquor und im veränderten Verhältnis der leichten IgG-Ketten (κ/λ) zueinander (Vandvik, 1977). Nach akuten Infektionen des Menschen sind oligoklonale Antikörper noch ein Jahr nach einer Mumps-Meningitis (Vandvik et al., 1978) und vier Jahre nach einer Herpes simplex Enzephalitis (Skoldenberg et al., 1981) nachweisbar. In einigen Experimenten mit persistierenden ZNS Infektionen übersteigen die im Liquor (Griffin et al., 1978) bzw. im Gehirngewebe (Lipton & Gonzalez-Scarano, 1978) vorhandenen spezifischen IgGs sogar die Serumtiter.

Unspezifische Abwehrmechanismen allein können zwar eine Virusinfektion im ZNS begrenzen, die Art der Erkrankung und viele andere Parameter einer Infektion beeinflussen, die endgültige Entfernung des

Erregers aus dem ZNS ist jedoch, wie auch im übrigen Organismus, abhängig von der Immunantwort (Griffin & Johnson, 1977). Immunologische Toleranz oder eine defekte Immunantwort können somit je nach Virulenz des Erregers sowohl zu besonders schweren Infektionsverläufen, wie auch zu persistierenden Infektionen des ZNS führen. Bei Menschen, die unter Defekten der zellulären Immunität leiden, oder bei Patienten, die immunsuppressiv behandelt werden, können atypische ZNS-Infektionen mit Varicella-zoster Viren (McCormick et al., 1969), mit Zytomegalievirus (Dorfmann, 1973), Adenoviren (Chou et al., 1973) und Masern Virus (Wolinsky et al., 1978) beobachtet werden.

1.4.3 Möglichkeiten der Persistenzentstehung

Viren haben im Laufe ihrer Evolution vielfältige Möglichkeiten gefunden, dem Zugriff des Immunsystems zumindest zeitweise zu entgehen und in irgendeiner Form im Wirtsorganismus zu persistieren. Solche viralen Persistenzen können zum einen durch virale Mechanismen, zum anderen durch Fehler des Immunsystems hervorgerufen werden.

1.4.3.1 Virale Mechanismen

Für RNA-Viren, mit Ausnahme der Retroviridae, sind dabei die folgenden Mechanismen denkbar:

1.4.3.1.1 Ts-Mutanten

Ein Mechanismus, der für RNA-Viren diskutiert wird, ist die Mutation eines hochvirulenten Wildtypvirus, das die befallenen Zellen gewöhnlich lysiert, zu einer temperatursensitiven Mutante, die sich nur sehr viel langsamer vermehrt. Dadurch bleibt die befallene Zelle zunächst am Leben und die mutierten Viren sind eventuell in der Lage das Immunsystem zu unterlaufen. Insbesondere für den Fall, daß die Mutation die Oberflächenantigene F und HN betrifft und die infizierte Zelle dadurch für das Immunsystem nicht mehr erkennbar ist, erscheint dies denkbar.

Die Mutationsrate wird bei RNA-Viren pro Nukleotid und Infektionszyklus auf 2×10^{-5} bis 2×10^{-6} geschätzt und ist damit sehr

hoch. Nach Infektion von BHK-Zellen mit einer ts-Mutante des Sendaivirus, läßt sich bei nicht permissiver Temperatur eine persistierende Infektion in Zellkultur etablieren, ohne den starken zytopathischen Effekt zu beobachten, den eine Sendai-WT Infektion hätte (Kimura et al., 1975). Senkt man die Temperatur auf den permissiven Bereich, so kann ein Aufflackern der Virusvermehrung beobachtet werden. Der Defekt kann das M-Protein (Kimura et al., 1979, Ogura et al., 1981), das P- und HN-Protein (Kimura et al., 1975), wahrscheinlich aber auch alle anderen Virusproteine betreffen.

1.4.3.1.2 DI-Partikel

Defekte interferierende Viruspartikel (DI-Partikel), das sind unvollständige Produkte der Replikation mit verkürztem RNA-Genom, die während akuter Virusinfektionen entstehen, können ebenfalls Persistenzen hervorrufen (Roux & Holland, 1979, Roux & Waldvogel, 1981). Da DI-Partikel allein nicht in der Lage sind, alle viralen Proteine zu synthetisieren, können sie sich nur zusammen mit intakten WT-Viren und deren Enzymausstattung weitervermehren und dabei mit diesen um den Polymerasekomplex und die Glykoproteine kompetitieren. Dabei haben diese DI-Partikel den Replikationsvorteil eines kürzeren Genoms, wodurch ihr Anteil, auf Kosten der WT-Viren, immer stärker zunimmt (Kingsbury et al., 1970, Kingsbury & Portner 1970). Persistierende Virusinfektionen können aber auch ohne DI-Partikel entstehen (Yoshida et al., 1982). Außerdem werden DI-Partikel in vivo nie gefunden (mit einer Ausnahme: LCM-Viren), so daß auch dieser Mechanismus sicher nicht allein verantwortlich gemacht werden kann.

1.4.3.2 Effekte des Immunsystems

Die Neutralisation von Viren durch Antikörper ist nie vollständig. Passende Antikörper bilden mit den Virionen Aggregate. Dabei können nicht-neutralisierende Antikörper gegen "non critical sites" neutralisierenden Antikörpern gegen "critical sites" blockieren. Das führt zur Bildung einer persistierenden Fraktion von nicht neutralisierten Viren. Dieser Mechanismus ist in vitro nachgewiesen und in vivo durchaus denkbar (Mandel, 1983).

Erfolgen Virusinfektionen neonatal, noch in der immuntoleranten Phase, in der das Immunsystem lernt zwischen eigen und fremd zu unterscheiden, so erfolgt keine immunologische Reaktion auf die entsprechenden Antigene. Auf diese Art und Weise entsteht eine Persistenz von Viren der lymphozytären Choriomeningitis (LCMV) in Mäusen.

Durch Zugabe von virusspezifischen Antikörpern zu akut mit Masern infizierten Zellen kann man folgende Phänomene beobachten: Es kommt zum "Herausziehen" viraler Glykoproteine aus der Zellmembran, dem sogenannten "stripping", gleichzeitig häufen sich intrazellulär Nukleokapside an und schließlich kommt es zu einer reduzierten Synthese von P- und M-Protein (Fudjinami & Oldstone, 1980, 1983a). Gestützt auf diese Ergebnisse kann die Hypothese aufgestellt werden, daß die humorale Immunantwort auf eine akute Virusinfektion die Entstehung von Mutanten begünstigt, die insbesondere weniger Oberflächenantigene auf der Zelle produzieren. Damit könnten sie in den infizierten Zellen sozusagen untertauchen, weil derart infizierte Zellen vom Immunsystem nicht aufgespürt werden können. Solche Mutanten sind zwar nicht in der Lage selbst neue Zellen zu infizieren, da ihnen die hierfür erforderlichen Glykoproteine fehlen und haben damit eine drastisch reduzierte Virulenz, aber eine Weitergabe dieser Viren durch Phagozytose und die damit verbundene Verschleppung im Organismus ist denkbar. Der Transport und die Weiterverbreitung von Sendaiviren durch Makrophagen kann beobachtet werden (Verini & Lief, 1979). Nachdem die virulenten Wildtypviren schon längst aus dem Organismus eliminiert worden sind könnten derart mutierte Viren persistieren.

1.4.4 Persistierende Viren als Risikofaktoren der Immunpathologie

Die klassische Erkrankung, bei der persistierende Virusinfektionen immer wieder als auslösendes Agens diskutiert wurden und werden ist die Multiple Sklerose (MS). Mit ca. 500.000 Erkrankten allein in den Vereinigten Staaten ist sie die häufigste demyelinisierende Erkrankung des ZNS. Es handelt sich um eine schubweise, oder chronisch progredient verlaufende, degenerative Krankheit des ZNS beim Menschen, die zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr auftritt. Epidemiologische Studien, die die

MS mit anderen viralen Epidemien in Verbindung bringen, postulieren einen exogenen, übertragbaren Initiator der MS (Brody et al., 1972). Die Annahme, daß eine persistierende Infektion des ZNS Voraussetzung der MS sein könnte, wird durch die Tatsache untermauert, daß Antikörper gegen zahlreiche ubiquitär vorhandene Viren bei den MS-Patienten signifikant höhere Titer erreichen als in den Kontrollgruppen (Haire, 1977, Vandvik & Degre, 1975). Bis heute kann jedoch für kein Virus konkret behauptet werden, es wäre direkt an der Entstehung von MS beteiligt. Wahrscheinlich ist, daß kein spezifischer viraler Effektormechanismus vorliegt, sondern erst die Reaktion des Immunsystems auf die virusbedingten Veränderungen entscheidet, ob sich MS entwickelt oder nicht. Die Kombination nicht-immunologischer und immunologischer Mechanismen kann dann zu den ausgedehnten, irreversiblen Myelinschäden führen. Auch endogene Faktoren der Immunpathologie sind sicher mit beteiligt. Genetische Studien weisen darauf hin, daß HLA-Membran-Antigene die Empfindlichkeit für MS mitbestimmen (Stewart et al., 1983). Mechanismen, die zur Demyelinisierung führen können, sind z.B. Infektionen von Oligodendrozyten oder von Schwannschen Zellen (Mims, 1983). Einige Viruserkrankungen führen zu einer Autoantikörperbildung gegen intermediäre Filamente (Fujinami et al., 1983b). Eine weitere Möglichkeit für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen ist die Bildung von antiidiotypischen Antikörpern, die gegen die Idiotope von antiviralen Immunglobulinen gerichtet sind (Notkins et al., 1984). Solche Antikörper erkennen dann bestimmte Zellrezeptoren und können so, mit Hilfe des Komplements, Zellen lysieren. Auch Fälle von sogenannter "molekularer Mimikry" sind beschrieben, in denen Antikörper gegen virale Proteine auch zugleich körpereigene Strukturen erkennen. In diesem Zusammenhang wurde auch schon nach identischen Proteinsequenzen in viralen Proteinen und humanem Myelin gesucht und solche auch gefunden (Jahnke et al., 1985). So ist z.B. zwischen dem Nukleokapsidprotein von Masernviren und Staupeviren und dem humanen P₂-Protein eine Sequenz von 4 Aminosäuren identisch und nach einer unterschiedlichen Aminosäure folgt nochmals eine identische. Antikörper gegen die virale Sequenz würden wahrscheinlich mit dem P₂-Protein kreuzreagieren.

Humane Viruserkrankungen, für die zumindest teilweise durch das Immunsystem vermittelte Pathomechanismen diskutiert werden, sind z.B.

Hepatitis B (Gocke, 1975), kongenitale Rubellainfektionen (Sever et al., 1985) und rheumatoide Arthritis (Bennett, 1985, Simpson et al., 1984).

1.5 Paramyxoviren

1.5.1 Morphologie

Bei Paramyxovirus-Infektionen können sowohl immunpathologische Mechanismen, wie auch Persistenzen häufig beobachtet werden, und daher sind sie auch oft Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Paramyxoviren sind Partikel mit einem Durchmesser von etwa 150nm und enthalten einzelsträngige RNA. Die Hülle des Virions besteht aus einer Lipidmembran, in die glykosylierte Proteine eingelagert sind, die als Spikes herausragen (8-12nm Länge). Durch Chloroform- oder Ätherbehandlung wird die Lipidhülle und damit die Infektiosität der Virionen zerstört. Die Spike-Proteine sind für die Adsorption an, und die Penetration in die Zelle verantwortlich. Das Nukleokapsid im Inneren des Virions, das aus RNA und Proteinen besteht, ist helikal-symetrisch aufgebaut und hat je nach Genus einen Durchmesser von 12-17nm. Das Genom der Paramyxoviren ist mit 15 kB das längste aller bekannten einsträngigen RNA-Viren. Es besteht aus einer nicht segmentierten RNA negativer Polarität, die die genetische Information für 6 Strukturproteine enthält.

1.5.2 Virusproteine und Funktion

Das HN-Protein (72kD), ein Spike-Protein, besitzt sowohl hämagglutinierende als auch Neuraminidase Aktivität (Scheid et al., 1974). Die hämolytische Aktivität ist ebenfalls auf diesem Protein lokalisiert (Georges et al., 1981).

Das zweite Spike-Protein, das Fusions-Protein F, wird zunächst als Vorläufer-Protein F₀ (65kD) syntetisiert. Nach Einbau des Proteins in die Plasmamembran wird es durch eine zelleigene Protease in zwei Polypeptide F₁ und F₂ gespalten (Scheid et al., 1977, Scheid et al., 1978). Nur Viruspartikel mit gespaltenem Fusions-Protein sind für weitere Zellen infektiös.

Auf der Innenseite der Phospholipidmembran ist das sehr hydrophobe Matrix-Protein M (34-40kD) angelagert, das sowohl mit den Spike-Proteinen in der Membran, wie auch mit dem Nukleokapsid wechselwirkt, und deshalb eine entscheidende Rolle beim Budding des Virus innehat (Yoshida et al., 1976, Yoshida et al., 1979). Weiterhin stabilisiert es die Hülle des Virions (Dubois-Dalcq et al., 1984).

Das Nukleokapsid hat die Struktur einer linksgängigen Helix und besteht neben der genomischen negativ-Strang RNA aus dem Nukleokapsid-Protein NP (56-60kD), dem Polymerase-Protein P (79kD) und dem "Large"-Protein L (über 200kD). Ein Nukleokapsid ist etwa aus 2400-2800 Molekülen NP-Protein, ca.300 Molekülen P-Protein und ca. 30 Molekülen L-Protein zusammensetzt (Lamb et al., 1976). Das NP-Protein bindet mit seinem aminoterminalen Ende, das viele basische Aminosäuren enthält, an die RNA und schützt diese dadurch vor der Zerstörung durch Nukleasen (Morgan et al., 1984). Die Proteine P und L stellen gemeinsam den Polymerasekomplex dar.

In infizierten Zellen existiert weiterhin ein Nicht-Struktur-Protein, das aber nicht in reifen Virionen vorkommt und als C-Protein bezeichnet wird (Lamb & Choppin, 1978). Man vermutet, daß dieses Protein eine regulatorische Bedeutung für die virale Transkription und Replikation hat (Etkind et al., 1980).

1.5.3 Virusreplikation

1.5.3.1 Adsorption, Penetration, Uncoating

Die Replikation von Paramyxoviren beginnt mit der Adsorption der Virionen an die Zellmembran, wobei das HN-Protein an Sialinsäurereste bindet. Der zweite Schritt der Zellinfektion ist die Fusion der Virus-hülle mit der Zellmembran. Hierfür ist das in F₁ und F₂ gespaltene Fusions-Protein zuständig (Scheid & Choppin, 1974).

Nach dem Ablauf der geschilderten Vorgänge befindet sich das Nukleokapsid frei im Zytoplasma, wo die Synthese neuer Virionen stattfindet.

1.5.3.2 Eklipse, Maturation

Bereits 2-4 Stunden nach der Infektion kann neusynthetisiertes NP-Protein in der Zelle sichtbar gemacht werden (Örvell & Grandien, 1982). Die virale Proteinsynthese findet neben der zellulären statt, ohne daß diese durch einen speziellen Mechanismus (shut-down) gehemmt würde, wie dies z.B. bei NDV (Hightower & Bratt, 1974) oder Tollwutviren geschieht. Die viralen Glycoproteine F und HN werden über das endoplasmatische Retikulum und den Golgiapparat an die Zelloberfläche transportiert und durch einen hydrophoben Proteinteil hier verankert. Wegen seiner Affinität zu den membrangebundenen Glykoproteinen bindet das M-Protein an solche zytoplasmatischen Vesikel, die F- und HN-Proteine enthalten, und wird mit ihnen transportiert (Nagai et al., 1976). Alle anderen viralen Proteine, P, NP und L, befinden sich im Zytosol.

Die neu synthetisierten Nukleokapside werden durch Budding aus der Zelle ausgeschleust. Diese Knospung neuer Virionen findet schon 12-16 Stunden nach der Infektion statt und geschieht durch Vermittlung von M-Protein zwischen den Nukleokapsiden und den bereits auf der Zelloberfläche verankerten Glykoproteinen F und HN, wobei HN in seiner reifen Form entweder als Di- oder als Tetramer vorliegt.

1.6 Infektion von Ratten und Mäusen mit Sendaivirus D52 und 6/94

Sendaiviren wurden ursprünglich 1952 in Japan isoliert und anschließend auf der ganzen Welt gefunden. Obwohl diese Viren hauptsächlich bei der Maus vorkommen, wurden sie auch bei anderen Labornagern, beim Schwein und auch beim Menschen entdeckt. Die Infektion verläuft bei Mäusen oft subklinisch, und nur bei speziellen Mäusestämmen, und bei Co-Infektionen mit anderen Mikroorganismen, wie *Pasteurella pneumotropica* (Jakab, 1974) oder *Mycoplasma pulmonis* (Cassel et al., 1979) kommt es zu schweren, manchmal tödlichen Erkrankungen. Oft wird diese Viruserkrankung daher als Modell für humane Erkrankungen des Respirationstraktes verwendet (Tyrrel & Coid, 1970).

1.6.1 Das Sendaivirus 6/94

Das 6/94-Virus ist ein Paramyxovirus, das dem Sendaivirus nahe verwandt ist. Es wurde 1972 erstmals aus dem Gehirn zweier, an Multipler Sklerose verstorbener Patienten, isoliert (ter Meulen et al., 1972). Daß dieses Virus, das Sendaivirus 6/94 genannt wurde, den Parainfluenza 1 Viren zuzuordnen ist und keine signifikanten Unterschiede zu den mäusepathogenen Sendaivirusstämmen MN und Z sowie zu dem humanpathogenen Stamm D52 festzustellen sind, bewiesen serologische Tests. Die Proteinzusammensetzung erwies sich als identisch mit dem Sendaivirus D52 (Lewandowski et al., 1974) und das neue Virus war nicht humanpathogen (Lief et al., 1975). Die Temperatursensitivität von 6/94-Viren zeigt sich dadurch, daß sie sich bei 33°C im Hühnerei gut, bei 37°C jedoch nur schlecht vermehren. Dieses Virus persistiert in Zellkultur (Brüssow, 1983) genauso wie in vivo. So konnte virale RNA im Gehirn intracerebral infizierter Mäuse noch zwei Jahre nach der Infektion nachgewiesen werden (Koch et al., 1984). Das 6/94-Virus kann sich in Leukozyten (Bogen, 1977) und T-Lymphozyten der Maus vermehren, was zu einer Verschleppung im ganzen Organismus, vielleicht auch ins Gehirn, führen kann, wogegen Sendaivirus Wildtypstämme in diesen Zellen inaktiviert werden (Verini & Lief, 1979).

1.6.2 Intranasale Infektion

1.6.2.1 Pathologie

Im Gegensatz zu den geringen klinischen Symptomen zeigt sich bei der pathologischen und histopathologischen Untersuchung intranasal infizierter Tiere eine ernsthafte Rhinitis und eine Pneumonie. Die Läsionen in der Nasenhöhle und in der Lunge sind ab dem Postinfektionstag (PID) 1 zu sehen und bis ca. PID 20 in der Nase bzw. bis PID 40 in der Lunge nachzuweisen. Die ersten sichtbaren Veränderungen in allen Teilen des Respirationstrakts sind epitheliale Degenerationen und Infiltrationen der Mucosa durch neutrophile Granulozyten. Immunhistologische Untersuchungen entdeckten Sendaivirus Antigen in Nasenhöhle, Bronchen und Alveolen bereits am PID 1. Die Antigenmenge war am PID 3-4 maximal und durch

immunhistochemische Methoden nach dem PID 7 nicht mehr nachweisbar (Garlinghouse et al., 1987).

1.6.2.2 Verbreitung infektiöser Viren im Organismus

Infektiöse Sendaiviren können nach intranasaler Infektion bis PID 7 aus der Lunge isoliert werden, nicht jedoch aus Leber, Milz, Blut, Lymphknoten oder Leber (Blandford et al., 1971).

1.6.2.3 Immunantwort

Hämagglutinationshemmende Antikörper sind ab PID 7 nachweisbar, erreichen ca. 20 Tage nach der Infektion ihr Maximum und sind 9 Monate nach der Infektion bei Ratten nicht mehr nachweisbar. Die zellvermittelte Immunität, gemessen durch Lymphozyten Blastogenese, ist 7 Tage nach der Infektion nachweisbar, nach 3 Wochen maximal und nach 6 Monaten bereits wieder verschwunden.

Schon 3 Stunden nach der intranasalen Infektion ist Interferon in der Lunge zu finden. Die maximale Interferonkonzentration läßt sich nach 6 Stunden messen. Danach kommt es zu einem rapiden Abfall der Interferonmenge in der Lunge, bis nach 160 Stunden kein Interferon mehr nachzuweisen ist. Die Seruminterferontiter verhalten sich in ihrem zeitlichen Verlauf genauso, erreichen aber nur 25% der Lungentiter (Garlinghouse et al., 1987).

Zusammenfassend scheint die natürliche, intranasale Infektion mit Sendaiviren vorwiegend lokal an den Schleimhäuten des Respirationstraktes abzulaufen und geringe Tendenz zur Generalisation zu zeigen.

1.6.3 Intracerebrale Infektion

Um das Vordringen von Sendaiviren ins ZNS während natürlicher Infektionen zu simulieren und als Modell für virusinduzierte ZNS-Schäden wurden in vielen Untersuchungen Mäuse und Ratten intracerebral infiziert.

1.6.3.1 Pathologie

Die intracerebrale Infektion säugender Mäuse mit 6/94-Viren verursacht sowohl eine nekrotisierende Panenzephalitis, wie auch zu einem späteren Zeitpunkt des Krankheitsbildes eine nichtentzündliche Degeneration der weißen Gehirnssubstanz (Rorke et al., 1976, Wolinsky et al., 1976). Im Gegensatz dazu hat die Inokulation von 6/94-Viren in das Gehirn säugender Lewis-Ratten eher begrenzte Infektionen primär der Meningen und des Plexus chorioideus zur Folge, wobei die Ratten klinisch nicht erkrankten. Die Immunfluoreszenz war an den PIDs 3-4 deutlich positiv, jedoch nach einer Woche nicht mehr nachzuweisen. Nur ausnahmsweise konnte bei den Lewis-Ratten eine Degeneration der weißen Gehirnssubstanz gesehen werden (1 Fall von 16 infizierten Tieren, Gilden et al., 1978).

Die Tatsache, daß sich nach der intracerebralen Infektion athymischer Nacktmäuse mit 6/94-Virus keine Degenerationen der weißen Gehirnssubstanz feststellen ließen, spricht dafür, daß die pathologischen Veränderungen durch den Einfluß des Immunsystems entstehen (Lewandowski et al., 1975). Dabei spielen die zytotoxischen T-Zellen eine entscheidende Rolle (McFarland, 1974).

1.6.3.2 Immunantwort

Die Immunantwort auf intracerebrale Immunisierung mit 6/94-Viren erbrachte ein Ansteigen der gegen Gesamtvirusproteine gerichteten IgGs und IgAs sowohl im Liquor, als auch im Serum der untersuchten Balb/c Mäuse (Gerhard et al., 1978). Diese Untersuchung läßt zwar gewisse Schlüsse auf die Immunantwort gegen virale Antigene zu, aber da nur immunisiert und nicht infiziert worden war, sind keine prinzipiellen Schlußfolgerungen auf die Immunantwort im Laufe einer Virusinfektion möglich. Auch bleiben Änderungen der Immunglobulintiter, die durch virale Schäden an der Blut-Liquor-Schranke hervorgerufen werden unberücksichtigt.

Andere Arbeiten, die nur die Serumantikörper mittels des HAH-Tests mituntersuchen (Zgorniak-Nowosielska et al., 1976, Gilden et al., 1978), zeigen ein Ansteigen der hämagglutinationshemmenden Antikörper ab dem PID 7. Arbeiten über virusproteinspezifische Antikörpertiter im Liquor nach intracerebraler Infektion fehlen.

1.7 Systematische Untersuchung virusproteinspezifischer Immunglobulintiter in Serum und Liquor

Untersuchungen über Antikörper im Liquor cerebrospinalis beim Menschen, die hauptsächlich im Zusammenhang mit der MS-Ursachenforschung durchgeführt worden sind, stellten entweder nur unspezifische sogenannte oligoklonale Vermehrung von Antikörpern fest (Vandvik, 1977), oder beschränkten sich darauf, Immunglobuline nur gegen Gesamtvirusprotein auszutesten, z.B. gegen Masernviren (Vandvik & Degree, 1975). Auch Untersuchungen an Rattenliquores konnten nur solche Immunglobuline nachweisen, die spezifisch gegen Gesamtvirusprotein waren (Dörries & ter Meulen, 1984). Antikörper, die gegen einzelne virale Proteine gerichtet sind wurden im Liquor von Mäusen oder Ratten noch nicht bestimmt.

Schon in mehreren Arbeiten über intranasale Infektionen mit Sendai-viren wurden nebenbei die Antikörpertiter im Serum, entweder im ELISA oder im HAH-Test mitbestimmt (Garlinghouse et al., 1987, Blandford et al., 1971) oder auch nach Immunisierung mit Sendai-proteinen gesamtvirus-spezifische IgG und IgA-Titer in Serum und Liquor verglichen (Gerhard et al., 1978). Es fehlen jedoch Arbeiten, die konsequent die Immunglobulinantwort auf die beiden Infektionsmöglichkeiten intranasal und intracerebral vergleichend untersuchen. Auch die Einflüsse der Temperatursensitivität der verwendeten Viren auf die Antikörperantwort sind noch nicht ermittelt worden.

Um diese Untersuchungen durchführen zu können, war es zunächst nötig, eine nichtlethale Liquorpunktionstechnik bei Mäusen und Ratten in unserer Arbeitsgruppe zu etablieren. Dabei blieb zunächst fraglich, ob dies bei Mäusen überhaupt möglich wäre.

Weiterhin war es notwendig eine schnelle, hochsensitive Methode zur Bestimmung proteinspezifischer Antikörper auszuarbeiten, um mit geringen Serumengen z.B. bei Mäusen auszukommen. Das sollte eine häufige Probenentnahme an demselben Tier ermöglichen und die Notwendigkeit, mehrere Serumproben vereinigen zu müssen, verhindern. Weiterhin mußte die Methode in der Lage sein, in den geringen Liquormengen aus der Maus (10 μ l), die pro Punktion gewonnen werden können, und den wahrscheinlich geringen Antikörpertitern überhaupt spezifische Immunglobuline feststel-

len zu können. Mit Hilfe dieser Methode sollte dann überprüft werden, welche viralen Proteine im Laufe der Infektion die B-Zellen des Immunsystems am meisten stimulieren und in welcher zeitlichen Abfolge Antikörper gegen die einzelnen viralen Proteine im Serum und im Liquor auftauchen. Interessant war auch die Fragestellung, wie lange nach der Infektion noch IgGs nachzuweisen sind, ob die Immunglobulinproduktion eventuell andauert, was auf eine fortgesetzte Antigenstimulation durch eine produktive virale Persistenz schließen ließe. Auch die fortgesetzte Produktion sehr geringer Proteilmengen, die einem direkten Nachweis entgehen würden, könnten eventuell über den Verstärkungseffekt des Immunsystems indirekt durch persistierende Antikörpertiter noch detektiert werden.

Bei der Liquoruntersuchung interessierte insbesondere, ob hier Immunglobulintiter auftreten, die den Infektionsverlauf vielleicht in Richtung Persistenz oder okulte Infektion (Koch et al., 1984) modifizieren, oder aber auch Auslöser für immunpathologische Mechanismen sein könnten. Die Sendaivirusinfektion sollte dabei als Modell für schwere Erkrankungen des Menschen, wie z.B. SSPE, dienen.

1.8 Problemstellung

Als Beitrag zur Klärung viraler Persistenz- und Immunpathologiemechanismen soll die im Laufe einer Infektion auftretende Antikörperantwort gegen die verschiedenen Sendaivirus-Proteine untersucht werden. Hierfür müssen zunächst geeignete Methoden ausfindig gemacht werden, die es erlauben im Mikromaßstab sowohl im Serum, wie auch im Liquor erkrankter Ratten und Mäuse, die zuvor entweder intranasal oder intracerebral mit D52- oder 6/94-Virus infiziert wurden, virusproteinspezifische Antikörper zu ermitteln. Dabei sollen möglichst die Antikörper gegen die viralen Strukturproteine P, HN, NP, F und M erfasst werden. Die Ergebnisse sollen auch darauf hin untersucht werden, ob sie Rückschlüsse auf die Virusverbreitung im Wirtsorganismus zulassen.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

Chemikalien

Acrylamid	SERVA
Amidoschwarz	SERVA
Ammoniumpersulfat (APS)	MERCK
Anilinblau	SERVA
2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benz-thiazol-6-sulfonsäure) (ABTS)	SIGMA
Bisacrylamid	SERVA
Bromphenolblau	SERVA
Coomassie Brilliant Blue	SERVA
Desinfektionsmittel Lorasol V	TAD (Cuxhaven)
3,3'-Diaminobenzidin (DAB)	SIGMA
Ethanol abs.	RIEDEL DE HAEN
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	MERCK
Formaldehyd 37%	MERCK
Gelatine	DIFCO
Glycerin	SERVA
Glycin	SERVA
India Ink	PELIKAN
2-Mercaptoethanol	ROTH
Methanol p.A.	RIEDEL DE HAEN
Milchpulver 1,5% Fett	BUND
Natriumdodecylsulfat (SDS)	SERVA
NP 40	BRL
Repel-Silan	LKB
Rinderserumalbumin (BSA)	SIGMA
Silberniträt	RIEDEL DE HAEN
TEMED (N,N,N',N'-tetramethyl-ethylendiamin)	BIORAD
Trichloressigsäure (TCA)	MERCK
Tricine	SIGMA

Tris	SIGMA
Tween 20	SIGMA
Wasserstoffperoxid	MERCK
Xylol	RIEDEL DE HAEN

Antikörper:

Meerrettich-Peroxidase konjugierte anti-Maus IgG	DAKOPATTS
Meerrettich-Peroxidase konjugierte anti-Kaninchen IgG	DAKOPATTS
Meerrettich-Peroxidase konjugierte anti-Ratten IgG	DAKOPATTS
Meerrettich-Peroxidase konjugierte anti-Maus IgA	NORDIC

Serum gegen Sendaivirus-Gesamtprotein vom Kaninchen, das in unserem Labor hergestellt wurde.

Maus-monoklonale Antikörper gegen die Virusproteine HN, NP, und F, (Willenbrink, 1987).

Das Parainfluenza-1-Antiserum stammte von den Behringwerken.

Versuchstiere:

C-129 Mäuse wurden von R.Jaenisch, Pethe-Institut, Hamburg, zur Verfügung gestellt und in Martinsried weitergezüchtet.

Die Lewis-Ratten wurden bei Savo-Ivanovas/ Kisslegg im Allgäu bestellt und ebenfalls in Martinsried weitervermehrt.

Viren:

6/94-Virus-haltige Allantoisflüssigkeit aus Hühnereiern wurde von Prof. V. ter Meulen (Würzburg) zur Verfügung gestellt.

D52-Viren von ATCC (American type culture collection)

Erythrozyten:

Das für virologische Tests benötigte humane Blut der Gruppe Null lieferte das Klinikum Großhadern.

Hühnereier:

Bebrütete Hühnereier wurden vom Gut Heinrichsruh in Freising bezogen.

Zelllinien:

BSC: Affennierenzellen (ceropithecus monkey kidney cells) von ATCC (American type culture collection).

Medikamente:

Äther pro Narcosis	HOECHST
Ketamin (10 %)	WDT
Rompun (Xylacin)	BAYER

Sonstiges Material:

Mikrotiterplatten	NUNC
Dialysesschläuche	
Ausschlußgrenze 10000-12000 MW	
PG 15-20 A	UNION CARBIDE
Dialyseklappen	ROTH
Nitrozellulose BA 85	SCHLEICHER & SCHUELL
Immobilon-membran	MILLIPORE
Infusionsset 25 G x 0,75	TERUMO/ JAPAN
Gel-Bond-Film	LKB
Phast-system	PHARMACIA
Pufferstreifen für Phast-System	PHARMACIA
Easy-reader EAR 400	SLT Laborinstrumente

2.2 Puffer und Lösungen:

PBS

8,0 g NaCl
0,2 g KCl
1,15 g Na_2HPO_4
0,2 g KH_2PO_4
ad 1000 ml H_2O

Amidoschwarz Färbelösung

0,1 % Amidoschwarz
45 % Methanol
10 % Essigsäure

Puffer für die Gelelektrophorese:

Elektrophoresepuffer (10 x)

0,25 M Tris
1,5 M Glycin
0,1 % SDS

Acrylamid-Bisacrylamid Stammlösung:

40 % Acrylamid
1 % Bisacrylamid

Die Stammlösung wird durch ein Filter mit der Porengröße 0,45µm
filtriert.

Proteinprobenpuffer (2x):

0,13 M Tris-HCl pH 6,8
4 % SDS
0,1 % Bromphenolblau
20 % Glycerin
unmittelbar vor Gebrauch werden
10 % 2-Mercaptoethanol
zugemischt.

Elektroblotpuffer:

20 mM Tris-HCl pH 8,3

150 mM Glycin

20 % Methanol

Elektroelutionspuffer:

50 mM Ammoniumhydrogencarbonat

0,1 % SDS

Coomassie Färbelösung:

0,1 % Coomassie Brilliant Blue

30 % Methanol

Coomassie Entfärbelösung:

7,5 % Essigsäure

5 % Methanol

Puffer für ELISA

Coating-buffer:

35 mM NaHCO_3

15 mM Na_2CO_3

Waschlösung:

1,55 M NaCl

1 % Tween 20

Phosphat-Citrat-Puffer:

34 mM Zitronensäure

35 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

PBS-BSA-Puffer:

0,5 % BSA in PBS

ABTS-Lösung:

4 mg/ml ABTS
0,006 % H_2O_2
in PC-Puffer

Puffer für Immuno-Peroxidase Färbung:

Antikörperlösung:

50 mM Tris-HCl pH 8,0
0,25 % Gelatine
0,025 % NP 40
150 mM NaCl
3 % BSA

Waschlösung:

50 mM Tris-HCl pH 8,0
0,25 % Gelatine
0,025 % NP 40
150 mM NaCl
0,1 % BSA

Milchpulverlösung:

3 % fettarmes (1,5 %) Milchpulver
in PBS

DAB-Lösung:

0,5 mg/ml DAB
0,01 % H_2O_2
in 0,1 M K-Phosphatpuffer (pH 7,2)

Lösungen für das Phastsystem:

Puffer für selbstgegossene Gele:

1 M Natrium-Acetat
1 M Tris pH 6,4

Probenpuffer (2x):

0,13 M Tris-HCl pH 6,8

4 % SDS

0,5 % Bromphenolblau

10 % Mercaptoethanol unmittelbar vor Verwendung

Lösungen für optimierte Silberfärbung:

Lösung 1:

50 % Ethanol

10 % Essigsäure

Lösung 2:

10 % Ethanol

5 % Essigsäure

Lösung 3:

8,3 % Glutaraldehyd

Lösung 4:

0,25 % Silbernitrat

Lösung 5:

0,04 % Formaldehyd

2,5 % Na_2CO_3

Lösung 6:

5 % Essigsäure

Lösung 7:

10 % Essigsäure

5 % Glycerin

India Ink Färbelösung:

0,3 % Tween 20

0,1 % India Ink

in PBS

Färbelösung für Schaffner-Weißmann:

0,1 % Amidoschwarz

45 % Methanol

10 % Essigsäure

Entfärbelösung für Schaffner-Weißmann:

90 % Methanol

2 % Essigsäure

Elutionspuffer für Schaffner-Weißmann:

25 mM NaOH

0,05 mM EDTA

50 % Ethanol

2.3 Methoden

2.3.1 Virusvermehrung im Hühnerei:

D52-Viren und 6/94-Viren werden in der Allantoishöhle von 10 bis 12 Tagen bebrüteten Hühnereiern vermehrt. Hierzu zeichnet man zuerst unter der Schierlampe die Luftsackbegrenzung an. Die Inokulation von ca. 10ul Virussuspension, die vorher auf 1 KID eingestellt wurde, erfolgt ca. 2-3mm unterhalb der Luftsackbegrenzung, knapp neben der Vena umbilicalis sinistra, da hier die Allantoishöhle am größten ist. Nach Desinfektion mit Ethanol und vorsichtigem Abschleifen der Schale wurde mit Hilfe einer scharfen Kanüle, die ca. 3mm eingeführt wurde, beimpft. Die Nachbebrütung erfolgte für 72 Std vertikal bei 33°C für 6/94-Viren und bei 37°C für D52-Viren. Am Ende der Nachbrutperiode kommen die Eier für 12 Std in den Kühlschrank (+4°C) oder für ca. 30 min in die Kühltruhe (-20°C) um die noch lebenden Embryonen abzutöten und Blutungen in die Allantoisflüssigkeit zu vermeiden. Nach Öffnen der Eischale über der Luftblase und der Allantoishöhle wurde die virushaltige Flüssigkeit mit einer Pipette abgesaugt und sofort niedertourig in einer Christ Zentrifuge Zelldebris abzentrifugiert (2000 rpm, 10 min).

2.3.2 Virusreinigung

Durch Zentrifugieren im Beckmann Ti 45 Rotor (30000 rpm; 4°C; 45 min) werden die Viren aus der Allantoisflüssigkeit pelletiert. Nach Resuspendieren in PBS wird die konzentrierte Viruslösung in einem Beckmann SW 27 Zentrifugationsröhrchen über 25% ige Sucrose geschichtet und durch Zentrifugieren im SW 27 Rotor (22000 rpm; 4°C; 90 min) durch die Sucrose sedimentiert. Dadurch werden Verunreinigungen in Form von leichten Zellproteinen über der Sucrose zurückgehalten. Die gereinigten Viren (in PBS) wurden kurzfristig bei +4°C im Kühlschrank, längerfristig in der Dampfphase von flüssigem Stickstoff (bis zu -196°C) aufbewahrt.

2.3.3 Virologische Tests

2.3.3.1 Hämagglutinationstest (HA-Test)

Mit dem HA-Test werden die hämagglutinierenden Einheiten (HA) einer Viruslösung, als Maß für die Virusmenge bestimmt. Der Test wird in einer Mikrotiterplatte durchgeführt, wobei in jede Vertiefung zunächst 25ul PBS vorgelegt werden. Mit 25ul Virussuspension wird eine Verdünnungsreihe in 2er Schritten angelegt. Nach Zugabe von je 25ul 1%iger humaner O-Erythrozytensuspension und Inkubation für eine Stunde bei 4°C wird der Test abgelesen. Eine hämagglutinierende Einheit ist die Virusverdünnung, bei der gerade noch vollständige Hämagglutination eintritt, wobei 1HA ca. 1×10^7 6/94-Viruspartikeln entspricht.

2.3.3.2 Kulturinfektionsdosistest (KID)

Der KID-Test dient der quantitativen Bestimmung infektiöser Einheiten in einer Virussuspension (Channock & Johnson, 1964). Zuerst wird in jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte 25ul Zellkulturmedium vorgelegt, dann in 2er Schritten eine Virusverdünnungsreihe, ausgehend von 25ul, angelegt und schließlich 50ul Zellsuspension (BSC, ca. $7,5 \times 10^3$ Zellen) zugegeben. Der so angesetzte Test wird bei 37°C (33°C für 6/94-Viren) für 24 Std oder länger inkubiert. Die Ablesung erfolgt nach Zugabe von 25ul 1%iger humaner O-Erythrozytensuspension und Inkubation für eine Stunde bei 4°C, wobei die Erythrozyten entweder adsorbieren oder sedimentieren können. Der KID-Titer wird in KID/ml umgerechnet und ist die Virusverdünnung, bei der gerade noch eine Adsorption gesehen wird.

2.3.3.3 Hämagglutinationshemmungstest (HAH)

Der Hämagglutinationshemmungstest ermöglicht die Untersuchung von Blutseren infizierter Tiere auf hämagglutinationshemmende, antivirale Antikörper. Hierbei kommt es zu einer Reaktion zwischen Hämagglutininen auf der Virusoberfläche und spezifischen Antikörpern, so daß die Hämagglutinine blockiert werden und daher nicht mehr in der Lage sind, humane-O-Erythrozyten zu agglutinieren. In jede Vertiefung einer Mikrotiterplatte werden 25ul PBS vorgelegt und ausgehend von 25ul Serum

eine Verdünnungsreihe in 2er Schritten angelegt, dann je 4 HA 6/94-Virus in 25ul Virussuspension (möglichst genau eingestellt) zugegeben und der Test bei 22°C für 60 min inkubiert. Nach Zupipettieren von je 25ul einer 1%igen humanen O-Erythrozytensuspension werden die Erythrozyten entweder agglutiniert, falls Antikörper gegen die Hämagglutinine fehlen, oder sie sedimentieren in ca. 60 bis 90 min bei 4°C. Der HAH-Titer ist dann der reziproke Wert derjenigen Serumverdünnungsstufe, die gerade noch eine Hemmung der Hämagglutination zeigt. Als positives Kontrollserum wurde das Serum eines gut immunisierten Kaninchens oder das "Parainfluenza 1 Antiserum" der Behringwerke verwendet.

2.3.4 Gelelektrophoretische Methoden

2.3.4.1 Analytische SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Trennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht können vertikale Gele nach Laemmli (1970) verwendet werden. Die Gele haben die Maße 120x150x1,5mm und setzen sich aus einem 5% igem Sammel- und einem 10% igem Trenngel zusammen. Das Trenngel besteht aus einem Gemisch von 6,2ml Acrylamidstammlösung, 8,4ml Wasser, 9,6ml 1M Tris/HCl pH8,7, 256ul 10%igem SDS, 20ul Temed und 128ul 10%igem APS zusammen. Die Zugabe von APS muß zuletzt erfolgen, weil hierdurch die Polymerisation gestartet wird. Die Gellösung wird bis 3cm unter den oberen Rand der Polymerisationskassette gefüllt und vorsichtig mit Butanol überschichtet, um eine scharfe Trennlinie zu erhalten. Nach der Polymerisation wird das Butanol wieder abgesaugt.

Das 5%ige Sammelgel (120x20x1,5mm) wird aus 1,25ml Acrylamidstammlösung, 7,4ml Wasser, 1,25ml 1M Tris/HCl pH6,8, 100ul 10%igem SDS, 8ul Temed und 50ul 10%igem APS hergestellt. Die Polymerisationskassette wird bis zum oberen Rand aufgefüllt und zum Formen der Geldaschen ein Kamm in die Lösung getaucht, der nach der Polymerisation wieder vorsichtig herausgezogen wird. Der Probenauftrag erfolgt mit einer Hamilton-Pipette, nachdem die Proben zuvor mit gleichem Volumen Probenpuffer versetzt und 10 Minuten im siedenden Wasserbad gekocht wurden. Die Elektrophorese dauert ca. 15 Stunden bei Strombegrenzung auf 20mA, wobei als Elektrolyt 0,4M Glycin, 0,1% SDS, 0,05M Tris/HCl pH 8,3 verwendet wird.

2.3.4.2 Präperative SDS-Polyacrylamidelektrophorese

Das 10%ige Trenngel (180x180x3mm) und das 5%ige Sammelgel (180x20x3mm) wird wie unter 2.3.4.1. beschrieben, nur in vierfacher Menge, hergestellt. Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erfolgt bei 50mA im gleichen Elektrolyten solange, bis der Bromphenolblau-Marker gerade aus dem Gel heraus gelaufen ist.

Da Coomassie gefärbte Proteine oft nicht mehr gut aus dem Gel elektroeluiert werden können, werden zur Detektion der Proteinbanden nur zwei Randstreifen des präperativen Gels entsprechend gefärbt, danach wieder an das ungefärbte Gel angelegt und die entsprechenden Proteinbanden, ausgehend von der Randstreifenfärbung, mit dem Skalpell ausgeschnitten.

2.3.4.3 Phast-System (PHARMACIA)

Mit diesem System, das aus einer Trenn- und einer Entwicklereinheit besteht, ist es möglich sehr kleine (35x45x0,45mm), horizontale Polyacrylamidgele, die auf einer Trägerfolie haften, unter genau programmierten Bedingungen laufen zu lassen und anschließend automatisch zu färben.

2.3.4.3.1 Trenneinheit

Die auf der Trägermembran gebundenen Gele (gekauft oder selbsthergestellt) werden unter Vermittlung zweier pufferbeladener Agarosestreifen horizontal zwischen zwei Elektroden installiert. Die Agarosestreifen ersetzen die Puffertanks der konventionellen PAGE und beladen während einer Vorlaufphase das Gel mit SDS und den notwendigen Puffersubstanzen. Mittels eines Peltier-Elementes kann die Geltemperatur für den ganzen Trennvorgang konstant gehalten werden und beträgt hier immer 15°C. Das Herz der Anlage ist ein Mikroprozessor, der Informationen über Strom, Spannung und Leistung des Netzgerätes speichert, und so für äußerst reproduzierbare Laufbedingungen sorgt und weiterhin auch die Entwickler-Einheit steuert. Der Probenauftrag erfolgt über sogenannte "Proben Applikatoren", das sind Plastikrinnen mit Kapillarrillen, die entweder als 8er Kamm (1µl Probe/ Spur), als 12er Kamm (0,3µl Probe/ Spur) oder als präperativer Kamm mit einer durchgehenden Kapillarrinne

zur Verfügung stehen. Die Auftrennung der Proteine nimmt bei den meistens verwendeten 6,5%igen, selbsthergestellten Gelen ca. 1,5 Stunden in Anspruch, wobei der Strom auf 10mA begrenzt wird.

2.3.4.3.2 Entwickler-Einheit

Nach der Elektrophorese können die Gele in der Entwickler-Einheit silbergefärbt werden. Auch hier steuert der zentrale Mikroprozessor das Ansaugen der benötigten Lösungen, die Dauer der Färbeschritte und die Temperatur in der Färbekammer. Verwendet wird die vom Hersteller optimierte Färbemethode basierend auf dem Verfahren von Heukeshoven und Dernick 1985, wobei eine Färbung ca. 1,5 Stunden dauert.

2.3.4.3.3 Herstellung von Gelen für das Phast-System

Die für das Phast-System verwendeten Gele können leicht selbsthergestellt werden. Die Gelgießkassette (26x12,5cm) wird unter Verwendung von 0,45mm dicken Abstandshaltern aus Silikongummi und zwei Glasplatten zusammengebaut, wobei eine der Platten gut mit Repel-Silan (LKB) hydrophobisiert wird, um das spätere Auseinanderbauen zu erleichtern, die andere mit dem Trägerfilm (Gel-Bond-Film, LKB) abgedeckt wird.

Die Lösung für die 6,5%igen Gele besteht aus 3,25ml Acrylamidstamm-lösung, 2,3ml 1M Na-Acetat/ Tris pH6,4, 14,35ml Wasser, 14ul Temed und 134ul APS 10%ig.

Nach Polymerisation und Zerlegen der Kassette kann das auf der Trägerfolie haftende Gel in die benötigte Größe zurechtgeschnitten werden. In einer feuchten Kammer bei 4°C können solche Gele einige Wochen aufbewahrt werden.

2.3.4.4 Proteinfärbung im Gel

2.3.4.4.1 Coomassie Blue Färbung

Eine Möglichkeit zur Sichtbarmachung der aufgetrennten Proteine ist die Coomassie Blue Färbung. Hierfür werden die Gele 10 Minuten fixiert (10% TCA, 20% Methanol) und für 30 Minuten mit Coomassie Blue Färbelösung gefärbt. Danach wird bis zum gewünschten Kontrast, unter mehr-

maligem Wechsel der Entfärbelösung (7,5% Essigsäure, 5% Methanol), entfärbt.

Gele vom Phast-System werden entsprechend ihrer kleineren Ausmaße nur 2 Minuten fixiert und 10 Minuten gefärbt.

2.3.4.4.2 Silberfärbung

Mit Hilfe der sehr sensitiven Silberfärbung nach Heukeshoven und Dernik (1985) können Proteinmengen bis 20ng pro Bande gut detektiert werden. Die Färbung wird von der Entwickler-Einheit des Phast-Systems automatisch durchgeführt und arbeitet nach folgendem Schema:

Schritt	Lösung	Zeit	Temperatur
1	50% Ethanol, 10% Essigsäure	2min	50°C
2	10% Ethanol, 5% Essigsäure	2min	50°C
3	10% Ethanol, 5% Essigsäure	4min	50°C
4	8,3% Glutaraldehyd	6min	50°C
5	10% Ethanol, 5% Essigsäure	3min	50°C
6	10% Ethanol, 5% Essigsäure	5min	50°C
7	Wasser	2min	50°C
8	Wasser	2min	50°C
9	0,25% Silbernitrat	13min	40°C
10	Wasser	30sek	30°C
11	Wasser	30sek	30°C
12	0,04% Formaldehyd, 2,5% NaCO ₃	30sek	30°C
13	0,04% Formaldehyd, 2,5% NaCO ₃	4min	30°C
14	5% Essigsäure	2min	50°C
15	10% Essigsäure, 5% Glycerin	3min	50°C

2.3.4.4.3 Dokumentation

Zur Aufbewahrung werden die gefärbten Gele für 24 Stunden bei 80°C getrocknet und können danach wie Diapositive archiviert werden.

2.3.4.5 Elektroelution

Nach präoperativer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese werden die Seitenstreifen vom Gel abgeschnitten und mit Coomassie Blue gefärbt. Nachdem die Proteinbanden in den Randstreifen gut sichtbar sind, werden sie wieder an das Gel angelegt und die entsprechenden Bereiche des präoperativen Gels mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Elektroelution erfolgt in stimmgabelförmigen Glasröhrchen, wobei das Röhrchen, das die Gelstücke aufnimmt, einen weiten Hals hat. Die Proteine wandern entlang der angelegten Spannung zum unteren Ende des Röhrchens, das mit einem Dialyseschlauch verschlossen ist. Die Röhrchen, von denen bis zu vier in einer geeigneten Kammer untergebracht sind, werden mit Elutionspuffer beschickt und eine konstante Stromstärke von 6mA pro Röhrchen wird für 24 Stunden angelegt. Über das Röhrchen, das den anderen Teil der Gabel darstellt, wird die konzentrierte Proteinlösung von oben her in zwei Fraktionen abgenommen und anschließend im Phast-System mittels der Silberfärbung auf seine Reinheit überprüft.

Diejenigen Fraktionen, die nach einmaliger Reinigung nicht sauber genug sind, werden nochmal einer präoperativen SDS-PAGE und einer weiteren Elektroelution unterzogen. In den sauberen Fraktionen wird mit Hilfe der Schaffner-Weißmann Bestimmung die Proteinkonzentration ermittelt.

2.3.4.6 Proteinbestimmung nach Schaffner-Weißmann

Mit dieser Bestimmungsmethode (Schaffner & Weißmann, 1973) können Proteinmengen bis zu 0,5-µg nachgewiesen werden. Hierzu wird die proteinhaltige Probe zuerst mit Wasser auf 270µl verdünnt und nach Zugabe von 30µl 1M Tris/ HCl pH7,5/ 1% SDS und 60µl 60%iger TCA zwei Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Proben werden dann unter gleichzeitigem Absaugen auf einer Filterbank punktförmig auf Nitrozellulose aufgetragen. Zur Erstellung einer Eichkurve werden Aliquots einer BSA-Verdünnungsreihe analog behandelt und aufgetragen. Der Nitrozellulosestreifen wird dann 3 Minuten in der Schaffner-Weißmann Färbelösung gefärbt, zweimal mit Wasser gespült, dreimal jeweils 1 Minute mit der entsprechenden Entfärbelösung gespült und nochmals zweimal mit Wasser

gewaschen. Die gefärbten Proteinflecken werden mit einem Korkbohrer ausgestanzt und eine Stunde mit je 1ml Elutionslösung bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach Bestimmung der OD_{630} wird die Proteinkonzentration anhand der BSA-Eichkurve errechnet.

2.3.5 Immunologische Methoden

2.3.5.1 Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Die ELISA-Technik wurde erstmals von Engvall und Perlmann 1971 beschrieben und seitdem vielfach modifiziert. Allgemein können im ELISA entweder antivirale Antikörper oder virale Proteine in bestimmten Bereichen quantitativ und sehr sensitiv bestimmt werden.

Zum Quantifizieren von Antikörpertitern im Serum und Liquor wurde folgende Methode verwendet: 6/94-Virus Gesamtprotein oder gereinigte Virusproteine werden in Coating-Puffer (pH 9,5) auf 6µg/ml verdünnt. Die Adsorption von 50µl dieser Lösung pro Vertiefung an die Polystyrol-Mikrotiterplatten erfolgt für mindestens 12 Stunden bei 4°C, alle anderen Schritte dieses Tests werden bei Raumtemperatur durchgeführt. Nach Absaugen der Antigenlösung wird zweimal mit Waschlösung gewaschen, um ungebundene Proteinreste zu entfernen, danach zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 1 Stunde mit 200µl PBS/BSA-Puffer pro Vertiefung inkubiert, worauf nach weiterem zweimaligem Waschen mit Waschlösung die Antikörperbehandlung folgt.

Zuerst werden pro Vertiefung 50µl PBS/BSA vorgelegt und eine Serum- bzw. Liquorverdünnungsreihe angelegt. Während der einstündigen Inkubationszeit binden die Antikörper an die passenden Proteine. Nach dreimaligem Waschen mit Waschlösung wird mit Peroxidase gekoppelten, gegen die Immunglobuline entsprechender Spezies gerichteten, sogenannten zweiten Antikörpern inkubiert. Diese werden je nach Qualität ca. 1:500 in PBS/BSA verdünnt, pro Vertiefung werden 50µl eingesetzt und die Inkubationszeit beträgt wiederum 1 Stunde.

Vor der Farbreaktion wird die Platte viermal mit Waschlösung gewaschen, um nicht gebundene zweite Antikörper zu entfernen, und einmal mit PC-Puffer gewaschen, um pH 5 einzustellen. Jetzt wird pro Vertiefung 50µl ABTS-Lösung für genau 30 min zugegeben, und danach sofort in einem ELISA-Photometer (EAR-400 von SLT LABINSTRUMENTS) bei 405nm die Extinktion bestimmt (Referenzwellenlänge 495nm).

Als Maß für den Antikörpertiter wurden die Extinktionen (OD) einer definierten Serum- bzw. Liquorverdünnung verwendet, da in einem bestimmten Bereich die ELISA-Extinktion direkt proportional zu der Antikörpermenge in der zu untersuchenden Flüssigkeit ist (Engvall & Perlmann, 1971).

2.3.5.2 Immunoblot

2.3.5.2.1 Elektrotransfer

Nach Auftrennung in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) oder im Phast-System (0,45mm dickes, 6,5% iges Polyacrylamidgel), werden die Proteine entweder durch den konventionellen NaBelektrotransfer (Tobwin et al., 1979) für 12 Std bei 0,3mA/cm² Gelfläche oder mit Hilfe des Semidry-Elektrotransfers mit der Apparatur von Sartorius bei 2mA/cm² Gelfläche (max. 200mA) für 1-3 Stunden, je nach Geldicke, auf Nitrozellulose oder Immobilon (MILLIPORE) transferiert. Beide Verfahren können, was den Proteintransfer anbelangt, als gleichwertig gelten, wobei die Transferzeiten beim Semidryblot erheblich kürzer gehalten werden können. Die Nitrozellulose kann nach Proteinbeladung mehrere Wochen trocken, Immobilon nur einige Tage in PBS/BSA-Puffer bei 4°C aufbewahrt werden.

2.3.5.2.2 Immuno-Peroxidase Färbung

Als erster Schritt bei der Immuno-Peroxidase Färbung steht die Absättigung noch freier Bindungskapazitäten auf der Nitrozellulose (oder Immobilon). Dies kann mit drei verschiedenen Methoden erfolgen: Schwenken für ca. 15min entweder in der Antikörperlösung (2.2), in der Milchpulverlösung, oder in der PBS/BSA-Lösung.

In die zur Absättigung verwendete Lösung wird als zweiter Schritt der erste Antikörper (Serum oder Liquor) pipettiert, unter Schwenken eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und danach dreimal mit dem Waschpuffer oder auch einfach mit PBS gewaschen.

Als dritter Schritt erfolgt die Zugabe von peroxidasegekoppelten zweiten Antikörpern, die je nach Lieferfirma und Charge unterschiedlich (DAKOPATTS 1:500; NORDIC 1:1000) in Antikörperlösung verdünnt werden. Es schließen sich wieder drei Waschschrte mit Waschpuffer oder PBS an.

Vor Zugabe der DAB-Lösung für die Enzymreaktion wird die Nitrozellulose, falls mit Waschpuffer gewaschen wurde, nochmals mit PBS gewaschen, um BSA Reste zu entfernen.

Die Enzymreaktion, die je nach Signalstärke 20-30 min dauert, wird durch Absaugen der DAB-Lösung und Zugabe von K-Phosphatpuffer gestoppt. Um letzte Reste von Peroxidase und DAB-Lösung zu entfernen, wird schließlich nochmals mit K-Phosphatpuffer gespült. Die Immuno-Peroxidase gefärbte Membran wird zwischen Filterpapier getrocknet und auf Karton aufgeklebt gelagert.

2.3.5.2.3 Unspezifische Proteinfärbung auf Nitrozellulose

Um den erfolgreichen Transfer der Proteine aus dem Gel auf die bindende Membran zu überprüfen wurden die folgenden Methoden verwendet:

a Anilinblau-Färbung

Hierbei wird die Nitrozellulose für 5 min in der Anilinblau Färbelösung geschwenkt und danach durch dreimaliges Waschen für 1-2 min mit Entfärbelösung die überschüssige Farbe entfernt. So behandelte Nitrozellulose ist nicht mehr für die Immuno-Peroxidase Färbung zu gebrauchen. Die Färbemethode gilt als mittelsensitiv, denn es können bereits 200ng pro Bande detektiert werden.

b "India-Ink" Färbung

Zuerst wird die zu färbende Membran bei 37°C dreimal je 10 min mit PBS, 0,3 % Tween 20 gewaschen. Die Färbelösung enthält 0,1 % India-Ink (Zeichentusche von PELIKAN) in PBS, 0,3 % Tween 20. In dieser Lösung schwenkt man die Nitrozellulose 2-12 Std bis sie die gewünschte Farbintensität erreicht hat. Zu beachten ist, daß der Färbeprogang sehr langsam abläuft. Überschüssige Tinte wird kurz mit PBS, 0,3 % Tween 20 abgespült (Hancock & Tsang, 1983). Diese Methode ist sehr sensitiv, denn es können bis zu 20ng pro Bande detektiert werden.

2.3.6 Versuchstiere

Die C-129 Mäuse und Lewis-Ratten wurden bei 22°C und 60% Luftfeuchtigkeit gehalten und mit einer pelletierten, pathogenfreien Mäuse/Rattendiät ernährt. Alle verwendeten Käfige, in denen sich infizierte Tiere befanden, wurden bei 120°C autoklaviert, ebenso alle anderen Gegenstände, die im Rahmen der Tierhaltung mit infektiösem Material in Berührung gekommen sind.

Für die geplanten Infektionsversuche wurde die im Rahmen des Tierschutzgesetzes in der Fassung vom 18. 8. 1986 vorgeschriebene Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern eingeholt.

2.3.6.1. Narkose

Für alle beschriebenen Eingriffe wurden die Tiere in eine Ketamin/Rompun Narkose gelegt. Eine Prämedikation ist hierbei im allgemeinen nicht erforderlich, allerdings sollten die Tiere einige Stunden vor der Narkose kein Futter mehr bekommen. Die erforderliche Dosierung beträgt bei Ratte und Maus 100mg/ Kg Körpergewicht Ketamin mit 15mg/ Kg Körpergewicht Xylacin, die intramuskulär in einer Mischspritze appliziert werden. Die Wirkung tritt nach ca. 5-10 Minuten ein, die chirurgische Toleranz beträgt 120 Minuten (bei der Maus 90 Minuten) und die Nachschlafphase dauert ca. 2 Stunden. Es tritt eine deutliche Atemdepression ein. Um das Auskühlen der Tiere während der Narkose zu verhindern ist eine geeignete Wärmezufuhr, z.B. über ein Heizkissen oder eine Rotlichtlampe zu empfehlen, denn falls die Körpertemperatur unter 33°C sinkt, überleben die Tiere die Narkose nicht.

2.3.6.2 Serumgewinnung

Die Blutgewinnung erfolgt sowohl bei Ratten wie auch bei Mäusen aus einer Schwanzvene. Nach Rasieren und Abtupfen mit Xylol wird ein geeignetes Blutgefäß mit dem Skalpell leicht geritzt. Das austretende Blut wird mit einer Eppendorfpipette gesammelt, ca. 1 Stunde stehengelassen und dann abzentrifugiert. Das so gewonnene Serum wurde kurzfristig (einige Tage) bei 4°C gelagert oder bei -20°C eingefroren.

2.3.6.3. Liquorgewinnung

Die Liquorgewinnung bei Ratten und Mäusen erfordert eine gewisse Übung und wird über die Punktion im Atlantooccipital-Gelenk mittels einer 25G x 0,75 Butterfly-Kanüle mit angeschweißtem Schlauch vorgenommen. Vor der Punktion wird die Einstichstelle mit 70% igem Ethanol desinfiziert. Aus der Ratte können so ca. 100ul, aus der Maus ca.10ul Liquor gewonnen werden. Der zeitliche Abstand zwischen zwei Punktionen am gleichen Tier sollte mindestens 10 Tage betragen.

2.3.6.4 Intranasale Infektion

Die intranasale Infektion erfolgte durch Eintropfen der auf die entsprechende Infektionsdosis eingestellten Virussuspension (in PBS) in die beiden Nasenlöcher des mit Äther leicht narkotisierten Tieres.

2.3.6.5 Intracerebrale Infektion

Die intracerebrale Infektion erfolgte in den Liquor, wobei im Prinzip wie bei einer Liquorpunktion vorgegangen wurde. Die zu applizierende Menge Virussuspension wurde dabei in den Schlauch der Butterflykanüle vorgelegt, nach Punktion durch kurzes Aspirieren der richtige Sitz der Nadel überprüft und schließlich die Infektionsdosis injiziert.

3. ERGEBNISSE

3.1 Infektion der Tiere und Symptomatik der Erkrankung

3.1.1 Herstellung des Infektionsmaterials

Sendaiviren vom Stamm D52 (im folgenden D52-Viren genannt) und Sendaiviren vom Stamm 6/94 (im folgenden als 6/94-Viren bezeichnet) vermehren sich in den Epithelzellen der Chorioallantoismembran von 10 Tage bebrüteten Hühnereiern sehr gut. Die reifen Virionen werden dabei in die Allantoisflüssigkeit abgegeben und können aus ihr gewonnen werden (2.3.1). Die Ausbeute an virushaltiger Allantois betrug 5-10ml pro Ei. Für die Bestimmung des Titers infektiöser Viren in der geernteten Allantoisflüssigkeit wurde der KID-Test verwendet. Die für die Infektion verwendete Allantoisflüssigkeit enthielt 500.000 KID/ml D52- bzw. 640.000 KID/ml 6/94-Viren.

Um zu zeigen, daß die Proteinzusammensetzung der vermehrten Viren mit der des Impfvirus identisch ist, wurde wie folgt verfahren: Nach Reinigung der Viren (2.3.2) und Proteinbestimmung im Schaffner-Weißmann Test (2.3.4.6) wurde ein Aliquot der Virussuspension in Probenpuffer aufgenommen und neben dem Impfvirus als Marker auf ein Polyacrylamidgel (2.3.4.1) aufgetragen. Das Ergebnis zeigte, daß sowohl das Molekulargewicht der viralen Proteine, wie auch das Muster der Immuno-Peroxidase Färbung mit einem antiviralen Gesamtserum mit dem des Impfvirus übereinstimmte, und es sich somit um Sendaiviren handelt.

3.1.2 Klinische Symptomatik nach intranasaler Infektion von Ratten und Mäusen

Nach Bestimmung der Infektiosität der Viren in der Allantoisflüssigkeit wurden C-129 Mäuse und Lewis-Ratten intranasal infiziert. C-129 Mäuse wurden deshalb verwendet, weil für diesen Stamm bereits gezeigt werden konnte, daß 6/94-Viren im Gehirn dieser Tiere persistieren können (Koch et al., 1984), Lewis-Ratten wegen ihrer bekannten Empfänglichkeit für Autoimmunerkrankungen. Die intranasale Infektion wurde, unter Einhaltung ausreichender Sicherheitsmaßnahmen, durch Eintropfen virushaltiger Allantoisflüssigkeit in beide Nasenlöcher der Tiere durchgeführt.

tiger Allantoisflüssigkeit in beide Nasenlöcher der Tiere durchgeführt. Es wurden pro Maus 5000 KID in 10ul und pro Ratte 50.000 KID in 100ul D52 bzw. 6/94-Viren inokuliert, wobei die Tiere zuvor durch eine leichte Äthernarkose immobilisiert worden waren.

Nach Infektion mit 6/94-Viren bleiben die C-129 Mäuse in den ersten 4 Tagen klinisch ohne besonderen Befund. Am PID 5 und 6 erscheinen die Tiere leicht apathisch und niesen bereits vereinzelt. Das Maximum klinischer Symptomatik ist am PID 8, 9, und 10 festzustellen: Dies äußert sich darin, daß die Mäuse häufig niesen, sich vermehrt putzen und in ihrer Aktivität reduziert sind. Ab dem PID 14 sind keine Krankheits-symptome mehr erkennbar. Insgesamt blieb die Symptomatik, wie auch in der Literatur beschrieben (Garlinghouse et al., 1987), gering und nur im Vergleich mit gesunden Kontrolltieren lassen sich die oben aufgezählten Veränderungen bemerken. Die Lewis-Ratten zeigen nur am PID 3-5 die Symptome einer leichten Rhinitis und bleiben sonst ohne Symptomatik.

Obwohl die D52-Viren bei Zellkulturinfektionen, durch früheren zytopathischen Effekt und schnellere Zellyse, deutlich aggressiver als 6/94-Viren sind, unterscheidet sich die Symptomatik bei intranasalen Ratten- bzw. Mäuseinfektionen kaum. Auch nach intranasaler D52-Virus Infektion kommt es ab dem PID 5 zu leichten respiratorischen Symptomen, die ihren Höhepunkt am PID 7-8 haben und sich dadurch äußern, daß die Tiere niesen und sich vermehrt putzen. Bei den Mäusen sind ab dem PID 15, bei den Ratten schon ab dem PID 9 keine klinischen Symptome mehr feststellbar.

3.1.3 Methodik und klinische Symptomatik der intracerebralen Infektion von Ratten und Mäusen

Aus zwei Gründen wurde für die intracerebrale Infektion die Applikation in den Liquor gewählt: Zum einen ist so die Traumatisierung des Gehirngewebes minimal, zum anderen können auch während einer natürlichen Infektion virusinfizierte Makrophagen über den Liquor ins Gehirn gelangen und hier Viren freisetzen und somit prinzipiell den gleichen Infektionsweg beschreiten. Die sonst oft geübte Methode der Injektion der Virussuspension durch die noch weiche Schädelkalotte kann nur bei jungen Tieren angewendet werden. Außerdem löst sie eine ungleich stärkere Traumatisierung aus und erreicht immer nur eine Gehirnhälfte.

Die intracerebrale Infektion erfolgte mittels eines Infusionssets 25 Gx 0,75, der aus einer Kanüle mit einem angeschweißten Schlauch be-

steht, in dem die zu injizierende Virussuspension vorgelegt wird. Nach kurzer Aspiration, um den richtigen Sitz der Kanüle festzustellen, wird die Virussuspension in den Liquor appliziert. Die Viren infizieren vom Liquor aus die ventrikulären Epithelzellen, die für Sendaviren sehr empfänglich sind (Ito et al., 1983) und können sich von hier aus im restlichen Gehirn ausbreiten. Es wurden 5000 KID/ Maus in 10ul und 50.000 KID/ Ratte in 100ul Volumen, D52- bzw. 6/94-Viren appliziert.

Nach intracerebraler Infektion mit 6/94-Viren ist in der klinischen Symptomatik ein deutlicher Unterschied zwischen C-129 Mäusen und Lewis-Ratten zu beobachten. Während die Lewis-Ratten die Infektion mit immerhin der 10fachen Virusdosis nach kurzer Zeit (1-2 Tage) mit Allgemeinsymptomen, wie Apathie und geringer Freßlust, überwunden haben, zeigt sich bei den Mäusen ein viel ausgeprägteres Krankheitsbild. Erst nach 22 Tagen mit stärkeren Allgemeinsymptomen, wie Apathie, gesträubtem Fell und verminderter Aktivität, verschwindet die Symptomatik bei den C-129 Mäusen.

Da die C-129 Mäuse schon nach intracerebraler Infektion mit den temperatursensitiven 6/94-Viren ausgeprägte klinische Symptome zeigten, wurde, um die Zahl der verwendeten Tiere nicht unnötig zu erhöhen, auf die intracerebrale Infektion von Mäusen mit D52-Viren verzichtet. Von den 7 infizierten Ratten zeigten die meisten nur 1-2 Tage nach der Infektion Apathie und verminderte Freßlust und waren danach wieder klinisch gesund. Eine Ratte erholte sich jedoch nicht mehr von der Infektion und starb am PID 4.

3.1.4 Untersuchung der Seren auf infektiöse Viren

Um festzustellen, ob es nach intracerebraler oder intranasaler Infektion mit D52- oder 6/94-Viren nach lokaler Virusvermehrung durch eine Virämie zur Verteilung der Erreger im Organismus kommen kann, wurden mit je 50ul frischen Serums, an verschiedenen Tagen nach der Infektion der KID-Titer bestimmt (2.3.3.2). Übereinstimmend mit Literaturdaten (Blandford et al., 1971, Garlinghouse et al., 1987) ließ sich in keinem Fall eine Virämie nachweisen (Tab.1). Die akute Infektion mit Sendaviren verläuft offensichtlich hauptsächlich lokal, beschränkt auf die primär affinen Gewebe des Respirationstraktes.

Um eine Positivkontrolle zu diesem Ergebnis zu erhalten, wurden zwei Mäusen je 5000 KID 6/94-Virus intravenös injiziert. 6 Stunden nach der

Infektion betrug der KID-Titer 160 KID/ml Serum, nach 24 Stunden 40 KID/ml und 48 Stunden nach der Infektion war kein KID-Titer mehr meßbar. Nimmt man für eine Maus eine Gesamtblutmenge von 1ml an, so bedeutet das, daß bereits nach 6 Stunden 97% der injizierten, infektiösen Viren aus dem Blut eliminiert oder inaktiviert worden sind. Ein Teil der Viren ist sicherlich durch unspezifische Abwehrmechanismen zerstört worden, ein anderer Teil wahrscheinlich mit dem Blut zu empfänglichen Zellen des Respirationstraktes transportiert worden.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß eine Virämie für mindestens 24 Stunden nachgewiesen werden könnte, aber die Viren offensichtlich nach intranasaler Infektion nicht in der Lage sind massiv ins Blut überzutreten.

Tabelle 1: KID-Titer* im Serum infizierter Tiere

PID	C-129 Mäuse			Lewis-Ratten			
	I			I			
	I D52	6/94	6/94	I D52	D52	6/94	6/94
	I i.n.	i.n.	i.v.	I i.n.	i.c.	i.n.	i.c.
0.5			+				
1			+	-	-	-	-
2			-	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-
4	-	-		-	-	-	-
5	-	-		-	-	-	-
6	-	-		-	-	-	-
7	-	-					
8	-	-					
9	-	-					
10	-	-					
11	-	-					
12	-	-					
13	-	-					
14	-	-					

* Der KID-Test wurde wie unter 2.3.3.2 beschrieben durchgeführt.

3.2 Antikörper in Serum und Liquor

3.2.1 Liquor- und Serumgewinnung

Zur Blutabnahme und Liquorgewinnung wurden die Tiere in eine Ketamin/Rompun-Narkose gelegt (2.3.6.1). Ungefähr 10-15 Minuten nach intramuskulärer oder subkutaner Injektion des Narkotikums haben die Mäuse bzw. Ratten das Toleranzstadium erreicht. Die Blutabnahme erfolgt durch Anritzen einer Schwanzvene, wobei aus einer Maus ca. 100-200ul aus einer Ratte ca. 0,5-1,0ml Blut gewonnen werden können. Nachdem das Blut geronnen und abzentrifugiert worden war, wurde das so gewonnene Serum für den KID-Test frisch verwendet, oder höchstens kurz im Kühlschrank aufbewahrt, für die immunologischen Verfahren bei -20°C eingefroren.

Für die Liquorgewinnung am lebenden Tier ist es wichtig, den Kopf des Tieres stark abzuwinkeln, um das Atlanto-occipital-Gelenk entsprechend zugänglich zu machen. Die Punktion erfolgt wie unter 2.3.6.3 beschrieben. Aus einer Maus können ca. 10ul, aus einer Ratte ca. 100ul Liquor gewonnen werden. Mit Blut verunreinigter Liquor cerebrospinalis wurde verworfen, brauchbare Proben bei -20°C eingefroren. Zwischen zwei Punktionen am gleichen Tier sollten mindestens 10 Tage liegen, da die Liquorentnahme doch eine erhebliche Belastung für die Ratten und Mäuse darstellt.

3.2.2 IgG- und IgA-Titer gegen Gesamtvirusprotein im Serum D52- und 6/94-Virus infizierter Mäuse

Es wurden 19 C-129 Mäuse mit 5000 KID 6/94-Viren und 5 Mäuse mit 5000 KID D52-Viren intranasal infiziert. Da C-129 Mäuse aufgrund ihres dunklen Fells nur schlecht zu markieren sind, und eine Einzelhaltung der Tiere aus Platzgründen nicht möglich war, wurden die zu untersuchenden Mäuse zufällig aus der infizierten Versuchstiergruppe entnommen. Durch Umsetzen in andere Käfige wurde allerdings darauf geachtet, daß sich die Blutentnahmen an einem Tier in nicht zu kurzem Abstand wiederholten.

Die erste Blutabnahme erfolgte am PID 4, die letzte bei den D52-Virus infizierten Tieren am PID 63, bei den 6/94-Virus infizierten am PID 112. Die gewonnenen Seren wurden mit der ELISA-Technik (2.3.5.1) auf anti-

virale Antikörper untersucht. Hierfür wurden die gesamtviralen Proteine an eine Mikrotiterplatte gebunden. Die zu untersuchenden Seren wurden in einer Verdünnungsreihe als erster Antikörper zugegeben. Die Menge der gebundenen Antikörper konnten dann mit einem Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper und einer folgenden Enzymreaktion meßbar gemacht werden. Im Graphen (Abb. 1 und 2) aufgetragen sind die OD-Werte, die mit einer 1:100 Serumverdünnung jedes untersuchten Tieres erhalten wurden. Als Negativkontrolle diente das Serum eines uninfizierten Tieres, als Positivkontrolle ein antivirales Gesamtserum vom Kaninchen.

Da im Bereich des linearen Abfalls der optischen Dichte die OD_{405} direkt proportional zu der Konzentration des ersten Antikörpers ist (Engvall et al., 1971), können die OD-Werte einer ausgewählten Verdünnungsstufe als Maß für die virusspezifische Immunglobulinkonzentration verwendet werden. Um diese Zahlen miteinander vergleichen zu können, ist es sehr wichtig, das Procedere der ELISA-Technik immer exakt gleich zu halten. Werte, die direkt miteinander verglichen werden sollen, müssen möglichst auf derselben Mikrotiterplatte ermittelt werden. Insbesondere die Einwirkzeit der Peroxidase auf die ABTS-Lösung ist dadurch genau einzuhalten, daß exakt 30 Minuten nach Zugabe der Lösung die Platten im ELISA-Reader ausgewertet werden.

Die IgG anti-Gesamtprotein Bestimmung wurde mit PBS-BSA als Absättigungs- und Antikörperlösung durchgeführt. Dagegen ist PBS-BSA bei der IgA anti-Gesamtprotein Bestimmung deshalb nicht geeignet, weil der anti-Maus-IgA Peroxidase gekoppelte Antikörper von Nordic mit BSA stark kreuzreagiert. Statt PBS-BSA wurde daher Milchpulver (1,5% Fett) 3%ig in PBS verwendet, wodurch unspezifische Bindungen des zweiten Antikörpers (1:1000 verdünnt) weitgehend vermieden werden können. Die so ermittelten OD-Werte der IgG- bzw. IgA-Bestimmung sind aufgrund der unterschiedlichen Methodik sicherlich nicht direkt miteinander zu vergleichen. Sie geben nur die Größenordnung an, durch die sich die IgG-Titer von den IgA-Titern unterscheiden.

Man erkennt in Abb. 1 und 2 ab dem PID 6 bereits einen deutlichen Anstieg der virusspezifischen IgG-Titer. Nach einer exponentiellen Steigerung bis zum PID 10, erreicht die Antikörperkonzentration ein Plateau. Erstaunlich ist der nun folgende, äußerst langsame Abfall des Antikörpertiters. Auffällig ist weiterhin die stärkere Streuung der Antikörpertiter nach 6/94-Virusinfektion im Gegensatz zur D52-Virus Infek-

tion. Die Standardabweichung der gemessenen OD-Werte zwischen den PIDs 10 und 65 ist bei der 6/94-Virus Infektion mit 0,41 mehr als doppelt so groß wie bei D52-Virus Infektion mit 0,17. Die durchgehenden Kurven wurden bis zum PID 10 empirisch eingezeichnet. Ab dem PID 10 wurde die Regressionsgerade für die Meßpunkte bestimmt, und anhand dieser Geraden der weitere Kurvenverlauf eingezeichnet.

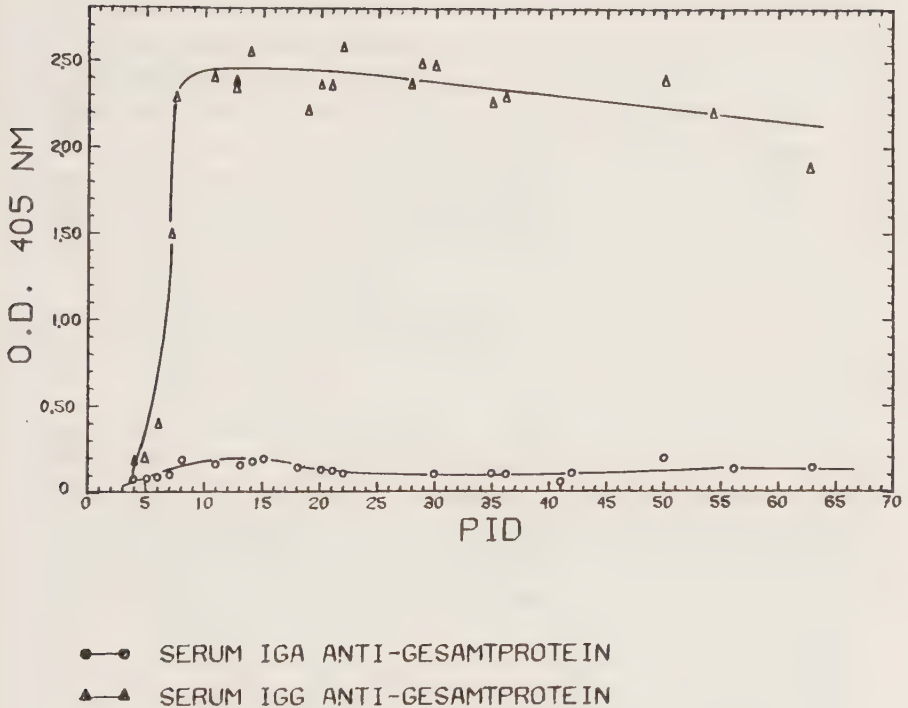
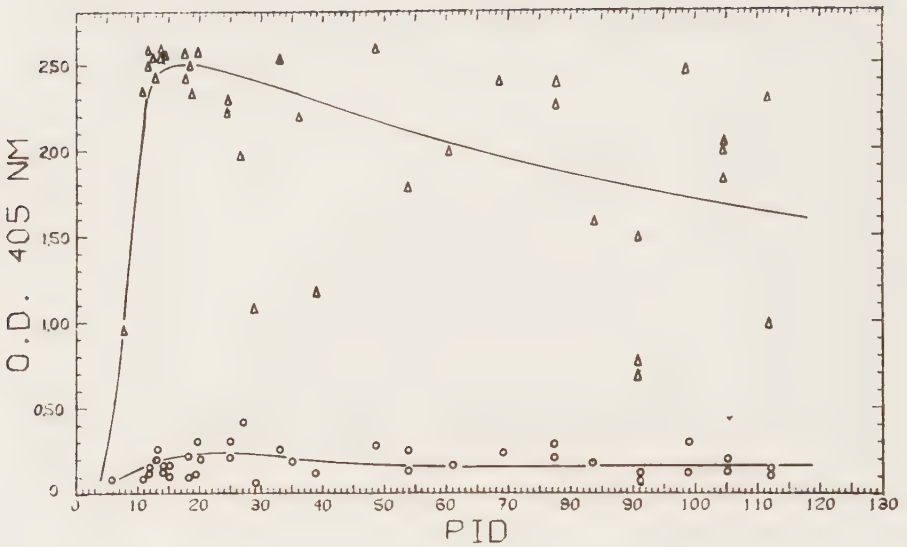


Abb. 1: ELISA-Titer mit Mäuseseren (intranasal infiziert mit 5000 KID D52-Viren) gegen Gesamtprotein

In jede Vertiefung einer Polystyrol-Mikrotiterplatte wurden 300ng mit 2M Harnstoff denaturierte, gesamtvirale Proteine für 12 Stunden bei 4°C gebunden. Bei 300ng pro Vertiefung liegt virales Protein im Überschuß vor, so daß ein Mehr an Protein auch bei hohen Antikörpertitern keine Steigerung der OD_{405} zur Folge hätte (Engvall et al., 1971). Als erster Antikörper wurde eine Serumverdünnungsreihe, ausgehend von 1 μ l Serum angelegt wurde. Als zweiter Antikörper wurde anti-Maus-IgG bzw. anti-Maus-IgA peroxidasegekoppelt verwendet. Auf der y-Achse wurden die OD-Werte der 1:100 Verdünnung aufgetragen.



- SERUM IGA GEGEN GESAMTPROTEIN
- ▲—▲ SERUM IGG GEGEN GESAMTPROTEIN

Abb. 2: ELISA-Titer mit Mäuseseren (intranasal infiziert mit 5000 KID 6/94-Virus) gegen Gesamtprotein

Die Elisatiter gegen virales Gesamtprotein wurden bestimmt, wie unter Abb. 1 beschrieben. Der erste Antikörper wurde in Form einer Serumverdünnungsreihe zugegeben, als zweiter Antikörper anti-Maus-IgG bzw. anti-Maus-IgA peroxidasegekoppelt verwendet. Auf der y-Achse wurden die OD-Werte der 1:100 Verdünnung aufgetragen.

Die in diesem Versuch gemessenen Antikörpertiter sind Immunglobuline der Klassen A und G, die an virales Gesamtprotein binden. Um nun mittels der ELISA-Technik Antikörper zu differenzieren, die einzelne virale Proteine erkennen, müßten zunächst die viralen Proteine sehr sauber voneinander getrennt werden. Die Reinheit der so getrennten Proteine müßte dann, um sicher vor Kreuzreaktionen zu sein, erst wieder getestet werden. Alle diese Schritte lassen sich im Western-Blot vereinigen und zudem ist die Gefahr von Kreuzreaktionen gebannt. Aus diesen Gründen wurde für die weitere, spezifischere Analyse der Antikörperantwort die folgende Mini-Western-Blot Technik ausgearbeitet.

3.2.3 Entwicklung eines Nachweissystems für Antikörper auf der Basis des Western-Blots

Ein Problem bei der Suche nach Antikörpern, insbesondere im Liquor von Mäusen und Ratten, sind die kleinen Probenvolumina von 10ul bzw. 100ul, die bei einmaliger Liquorpunktion gewonnen werden können. Will man, ohne mehrere Proben zu vereinigen, in so kleinen Volumina, geringe Antikörpertiter gegen einzelne Virusproteine finden, so bedarf es eines sehr sensitiven Testverfahrens, das wegen der großen Probenanzahl auch nicht allzu material- und arbeitsaufwendig sein darf. Um Gesamt-Immunglobulinmengen im Liquor zu bestimmen, wurden ELISA (Metha et al., 1987), Elektroimmunodiffusion (Schuller et al., 1973) und der RIA (Besch, 1975) beschrieben. Für den Nachweis virusspezifischer Antikörper gibt es die Methode der "Imprint-elektro-immunofixation" (Nordal et al., 1978) und den Immunblot (Karcher et al., 1981). Methoden, die radioaktiv markierte zweite Antikörper verwenden, z.B. RIA oder Western-Blot mit nachfolgender Autoradiographie, sind zwar sehr sensitiv, aber langwieriger. Aus diesem Grund sollte der übliche Western-Blot mit anschließender Immuno-Peroxidase Färbung miniaturisiert werden, um dadurch eine höhere Sensitivität zu erreichen.

3.2.3.1 Prinzip des Mini-Western-Blots

Nach präoperativer Auftrennung der Sendaivirus-Proteine mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und deren Transfer auf Nitrozellulose, wird diese in Streifen geschnitten. Auf jedem Streifen befinden sich

dann die aufgetrennten Virusproteine, wobei die Streifen untereinander als identisch zu betrachten sind. Als erster Antikörper in der Immuno-Peroxidase Färbung (siehe 2.3.5.2.2) wird die auf Antikörper zu untersuchende Flüssigkeit auf die Nitrozellulosestreifen gegeben. Die gebundenen Antikörper werden durch einen Peroxidase gekoppelten zweiten Antikörper und eine folgende Enzymreaktion sichtbar gemacht. Dadurch können virusproteinspezifische Antikörper detektiert werden.

Als sehr schnell und zuverlässig für die Auftrennung von Proteinen hat sich die Elektrophorese mit dem Phast-System (Pharmacia) erwiesen. Die auf eine hydrophile Trägerfolie polymerisierten Gele, käuflich oder selbsthergestellt, sind jedoch für eine Proteintransfer-Prozedur nicht geeignet, da sie nicht ohne Beschädigung von der Trägerfolie zu lösen sind. Ablöseversuche mittels dünner Drähte oder Skalpellklingen schlugen immer fehl.

Die logische Konsequenz war, die Gele auf eine nicht ganz so hydrophile Folie aufzubringen, von der sie leichter ablösbar wären. Die Frage war nur, ob das Gel auf so einer Trägerfolie noch fest genug haften würden, um das Gel mit Trägerfolie z.B. mit einer Schere in die richtige Größe zuschneiden und vor allem, um die Gelgießkassette zerlegen zu können, ohne die dünnen Gele zu zerstören. Nach einigem Probieren erwies sich die hydrophobe Seite der Gel-Bond Folie (LKB) als geeignet. Das Gel haftet auf dieser Oberfläche so gut, daß es beim Zerlegen der Gelgießkassette auf der Trägerfolie haftet, sich in die benötigte Größe zurechtschneiden läßt, aber nach der Elektrophorese trotzdem leicht von der Folie lösbar ist. Um den Ablösevorgang sicherer zu gestalten, wurde eine Absaugapparatur konstruiert, die an eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen ein Nitrozelluloseblatt ansaugt, welches genauso groß ist wie das zu blottende Gel (45mm x 35mm). Auf die fixierte Nitrozellulose wird nun das Gel mit Trägerfolie so gelegt, daß das Gel durch die Nitrozellulose hindurch angesaugt wird. Die auf der Oberfläche liegende Trägerfolie kann dann mit einem feinen Spatel vorsichtig abgelöst werden, ohne das Gel zu beschädigen.

Das auf der Nitrozellulose befindliche Gel wird nun zwischen je 2 Filterpapiere (Whatman 3MM) eingebettet und die Proteine durch den konventionellen Tankblot (Tobwin et al., 1979) auf die Nitrozellulose transferiert, oder zwischen je 5 Filterpapiere eingebettet und der Blot in der Semi-Dry Blotapparatur (Sartorius) durchgeführt (2.3.5.2.1).

Beide Verfahren haben sich in ihrer Transfereffizienz als gleichwertig erwiesen, wobei der Semi-Dry-Blot den großen Vorteil hat, in 45 Minuten abgeschlossen zu sein, während der Tank-Blot ca. 12 Stunden in Anspruch nimmt. Nach dem Blot wird die Nitrozellulose in Streifen geschnitten und mit dem zu untersuchenden Serum oder Liquor als erstem Antikörper Immuno-Peroxidase gefärbt.

3.2.3.2 Eigenschaften des Mini-Western-Blots

Um die gleichmäßige Verteilung der Virusproteine auf der Nitrozellulose zu zeigen, wurde ein nicht zerschnittenes Nitrozelluloseblatt Immuno-Peroxidase gefärbt

Das Ergebnis zeigt, daß die Auftrennung der Proteine im miniaturisierten System sehr gleichmäßig und zuverlässig erfolgt (Abb. 3). Das bedeutet, daß auch die Streifen ein gut reproduzierbares Proteinmuster aufweisen, was die Voraussetzung für die sichere Auswertung der Ergebnisse des Mini-Western-Blots ist.



Abb. 3 : Präparative Proteintrennung im Phast-System

Mit dem TC-Applikator wurden 8µg virales Gesamtprotein auf die ganze Gelbreite aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei konstant 10mA bis zu 65 VAh durchgeführt. Der Pfeil bezeichnet die auf der Nitrozellulose angezeichnete Position des Phenolblau-Markers. Die Immuno-Peroxidase Färbung wurde mit 16µl eines antiviralen Gesamtserums vom Kaninchen als erstem Antikörper durchgeführt.

Um die höhere Empfindlichkeit gegenüber dem üblichen Western-Blot zu demonstrieren, wurde ein Streifen eines konventionellen Immun-Blots, auf dem 75ug Virusprotein aufgetrennt worden waren, und ein Ministreifen, auf dem sich insgesamt 660ng Virusprotein befanden, unter gleichen Bedingungen mit je 1,5ul antiviralem Gesamtserum Immuno-Peroxidase gefärbt. Auf dem großen Streifen (Abb. 4 a) ist nur ein schwaches Signal gegen das NP-Protein zu erkennen, während auf dem kleinen Streifchen alle viralen Strukturproteine mit Ausnahme des L-Proteins deutlich zu sehen sind (Abb. 4 b). Die Miniaturisierung macht den Westernblot also deutlich sensitiver und kommt zudem mit geringeren Proteinmengen aus.

Genauso läßt sich die Sensitivität der Methode auch mit dem Serum einer Maus zeigen, die bereits 568 Tage vor der Blutabnahme mit Sendai-viren infiziert worden waren. Setzt man je 6ul dieses Serums als ersten Antikörper ein, so zeigt der große Westernblotstreifen kein Signal (Abb. 4 c), der Mini-Streifen jedoch eine schwache, aber signifikante Bande (Abb. 4 d). Um diese Bande als NP-Protein zu identifizieren, wurde ein Streifchen mit einem monoklonalen Antikörper gegen das NP-Protein Immuno-Peroxidase gefärbt (Abb. 4 e).



Abb. 4: Sensitivitätsvergleich zwischen Mini-Western-Blot und normalem Western-Blot

Streifen (a) und (b) wurden mit je 1,5ul antiviralem Gesamtserum vom Kaninchen Immuno-Peroxidase gefärbt, Streifen (c) und (d) mit 6ul Serum einer Maus, die vor 568 Tagen intracerebral mit 6/94-Viren infiziert worden war. Streifchen (e) wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen das NP-Protein Immuno-Peroxidase gefärbt. Auf den Streifchen (a) und (c) wurden je 75ug virales Gesamtprotein, auf den Streifchen (b), (d) und (e) je 660 ng aufgetrennt.

Schließlich wurde der Mini-Western-Blot auch noch mit der als sehr sensitiv bekannten ELISA Technik verglichen. Bei beiden Methoden wurden 3 μ l niedrigtitriges Mäuseserum (568 Tage nach der Infektion) verwendet. In beiden Fällen zeigt sich ein schwaches, aber signifikantes Signal (Abb. 5), wobei der Mini-Western-Blot Streifen mit dem Serum von Maus M4 Immuno-Peroxidase gefärbt wurde. Da der ELISA gegen virales Gesamtprotein gemacht wurde, kann aus dem schwachen ELISA-Titer nur geschlossen werden, daß ein niedriger Antikörpertiter gegen virales Gesamtprotein vorhanden ist. Der Western-Blot hingegen zeigt, daß die Antikörper gegen das NP-Protein gerichtet sind.

Dieses Experiment zeigt, daß der entwickelte Mini-Western-Blot genauso sensitiv ist wie die ELISA-Technik.

Maus	ELISA (Extinktion bei 405 nm)	Mini-Western-Blot
M1	0,198	
M2	0,253	
M3	0,125	
M4	0,270	
M5	0,151	
M6	0,136	
Neg. Kontrolle	0,080	
Behring-Serum	1,086	

Abb. 5: Vergleich des ELISA mit dem Mini-Western-Blot

Sowohl für den ELISA, wie für den Mini-Western-Blot wurden 3 μ l eines niedertitrigen Serums verwendet. Der ELISA wurde gegen Gesamtvirusprotein durchgeführt. Beide Testverfahren zeigen mit den gleichen Mengen Serum ein schwaches Signal. Als Negativkontrolle wurde bei diesem Experiment das Serum eines nicht infizierten Tieres verwendet, als Positivkontrolle ein 1:5 vorverdünntes anti-Sendai Gesamtserum (Behring).

Neben der schon geschilderten höheren Sensitivität, hat die beschriebene Mini-Western-Blot Methode noch den Vorteil der schnellen Durchführbarkeit. Die Elektrophorese auf dem Phast-System dauert ca. 75 Minuten, der Semidry-Elektrotransfer aufgrund der dünnen Gele 45 Minuten, die

Immuno-Peroxidase Färbung ungefähr 3 Stunden, so daß die gesamte Western-Blot Prozedur auf 5 Stunden verkürzt wird. Gegenüber dem konventionellen Western-Blot bedeutet das eine Zeitersparnis von ca. 22 Stunden.

3.2.3.3 Abschätzung der relativen Nachweisgrenze für virusspezifische Antikörper

Beim Menschen erreicht die Immunglobulinkonzentration im Liquor bei intakter Blut-Liquor-Schranke ca. 0,2% der Serumkonzentration, wobei im Gehirn gesunder Individuen keine Antikörper produziert werden (Johnson, 1982). Die im Liquor gefundenen Antikörper stammen also normalerweise aus dem Blut. Hieraus kann gefolgert werden, daß die gesunde Blut-Liquor-Schranke ein Verhältniss Liquor- zu Serumantikörpern von 1:500 aufrechterhält. Ein Verfahren, das in der Lage sein soll, im Liquor einen signifikanten Anstieg des Antikörpertiters zu detektieren, muß also in einer 1:500 Verdünnung eines hochtitrigen Serums noch spezifische Antikörper nachweisen können. Um das für das Mini-Blot-Verfahren zu testen, wurde mit einem hochtitrigen antiviralen Gesamtserum vom Kaninchen eine Verdünnungsreihe (je 1:2) angelegt. Beginnend mit 6ul, wurde das Serum bis zur Stufe 1:2048 ausverdünnt und mit den so verdünnten Seren Nitrozellulosestreifchen Immuno-Peroxidase gefärbt. Das Experiment zeigt, daß bei der Verdünnungsstufe 1:512, was ca. 0,01ul Serum entspricht, gerade noch virusspezifische Antikörper nachgewiesen werden können (Abb. 6i).

Somit sollte die Mini-Blot-Methode in der Lage sein, bei einer akut infizierten Maus oder Ratte, bei der eine ähnlich hohe Serumantikörperkonzentration wie bei einem gut immunisierten Kaninchen zu erwarten ist, im Liquor einen signifikanten Anstieg der virusproteinspezifischen Antikörpertiter zu detektieren. Weiterhin versetzt die Methode den Untersucher in die Lage, auch in sehr geringen Serummengen virusproteinspezifische Antikörper nachweisen zu können. Damit kann an einem Tier der Verlauf von Antikörpertitern im Serum engmaschig verfolgt werden.

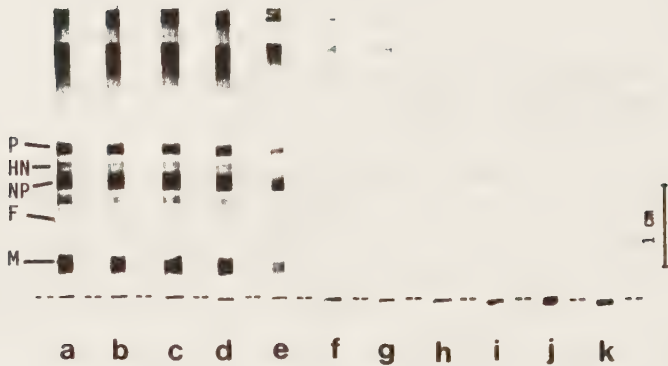


Abb. 6: Relative Sensitivität des Mini-Western-Blots

Die Mini-Western-Blot Streifchen (a)-(k) wurden mit einer Serumverdünnungsreihe in 2er Stufen Immuno-Peroxidase gefärbt. Für das Streifchen (a) wurden 6ul antivirales Gesamtserum vom Kaninchen in 0,5ml Antikörperlösung als erstem Antikörper eingesetzt. Die gestrichelte Linie gibt die Position des Phenolblau-Markers an.

3.2.4 Virusspezifische Immunglobuline, nachgewiesen durch den Mini-Western-Blot

Um die Proteinreinigung, die für die Bestimmung virusproteinspezifischer Antikörper durch den ELISA notwendig ist, mit ihren Unsicherheiten in Bezug auf Kreuzreaktionen zu umgehen, wurde der Mini-Western-Blot ausgearbeitet und seine Sensitivität charakterisiert. Dabei hat sich gezeigt, daß mit dieser neuen Methode auch in kleinen Probenmengen, selbst geringe Antikörpertiter, die gegen einzelne virale Proteine gerichtet sind, nachgewiesen werden können. Die Sensitivität des Mini-Western-Blots ist vergleichbar mit der ELISA-Technik. Damit sollte es möglich sein auch im Liquor einen Anstieg der virusproteinspezifischen Antikörpertiter zu verfolgen.

Im folgenden soll diese Methode nun auf den Nachweis virusspezifischer Antikörper im Serum und im Liquor Sendaivirus infizierter Mäuse und Ratten angewendet werden.

3.2.4.1 Untersuchung von C-129 Mäusen

Zunächst wurden mit Hilfe des Mini-Western-Blots die Antikörpertiter in Serum und Liquor von infizierten Mäusen ermittelt.

3.2.4.1.1 IgG-Titer im Serum nach intranasaler 6/94-Virus Infektion

Seren von C-129 Mäusen, die mit 5000 KID 6/94-Viren intranasal infiziert worden waren, wurden mit Hilfe der Mini-Western-Blot Methode auf Immunglobuline der Klasse G untersucht.

Zunächst wurden die Tiere willkürlich aus der Population von 19 infizierten Tieren entnommen. Untersuchte Tier wurden extra gesetzt, bis alle Mäuse einmal durchuntersucht worden waren.

Ab dem PID 6 sind Antikörper gegen das NP-Protein nachzuweisen, deren Titer bis zum PID 10 schnell ansteigt und danach , soweit das im Western-Blot zu erkennen ist, konstant bleibt (Abb. 7). Gegen das virale P-Protein gerichtete IgG-Titer sind ab dem PID 10 nachweisbar. Erstaunlicherweise sind im Mini-Western-Blot (auf Nitrozellulose) keine IgG-Titer gegen HN, F und M nachweisbar, obwohl das HN- und das F-Protein auf der Oberfläche infizierter Zellen und Virionen erscheinen und als Glykoproteine auch sehr immunogen sein müßten. Um zu zeigen, daß es sich bei den beobachteten Antikörpertitern nicht nur um einen Immunisierungseffekt handelt, und die Infektion eventuell gar nicht angegangen ist, wurden als Negativkontrolle zwei Mäuse mit Viren immunisiert, die mit SDS inaktiviert worden waren. Hierfür wurde die gleiche Menge Virusprotein verwendet, wie auch bei der Infektion. Die Seren dieser Tiere wurden am PID 10 und 15 im Mini-Western-Blot untersucht. Es konnten keine virusspezifischen Antikörpertiter detektiert werden.

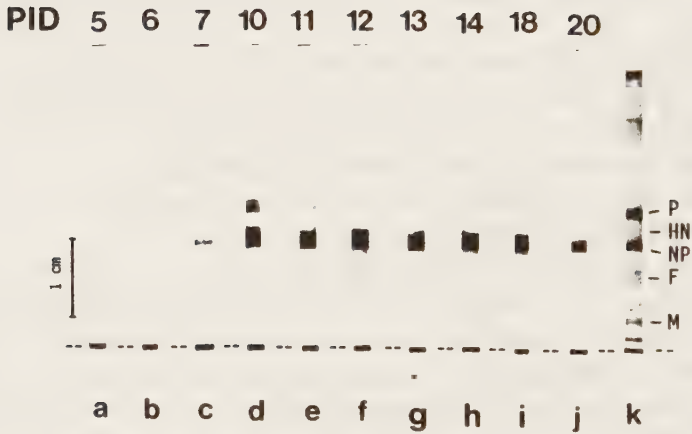


Abb. 7: IgG-Titer in Mäuseseren von intranasal mit 6/94-Virus (5000 KID) infizierten Tieren

Für die Streifchen (a)-(j) wurden je 3ul Serum, das an den oben angegebenen PIDs von verschiedenen Tieren gewonnen worden war, eingesetzt. Die Seren wurden als 1. Antikörper, in einer Verdünnung von 3ul Serum auf 0,5ml Lösung (ca. 1:170), eingesetzt. Als 2. Antikörper fand ein peroxidasegekoppelter anti-Maus-IgG (Dakopatts) in der Verdünnung 1:500 Verwendung. Als Positivkontrolle (k) wurde 1,5ul antivirales Gesamtserum vom Kaninchen für die Immuno-Peroxidase Färbung verwendet. Die gestrichelte Linie gibt die Position des Phenolblau-Markers an.

3.2.4.1.2 IgA-Titer im Serum nach intranasaler 6/94-Virus Infektion

Da bei einer Erkrankung des Respirationstraktes den Immunglobulinen der Klasse A eine wichtige Rolle bei der Infektionsbekämpfung zukommt, und außerdem bekannt ist, daß monoklonale IgAs, die gegen das HN-Protein gerichtet sind, vor Sendaiinfektionen schützen können (Mary et al., 1987), wäre es möglich, daß besonders gegen die Proteine HN, F und M, gegen die zunächst keine IgG-Titer nachgewiesen werden konnten, IgAs im Serum vorhanden sind.

Bei der Ermittlung der IgA-Titer ergab sich zunächst das Problem, daß die anti-IgA Antikörper (Nordic) 1:1000 verdünnt ein sehr starkes Hintergrundsignal lieferten, auf dem keine Banden sichtbar waren. Da auch weiteres Verdünnen der eingesetzten Antikörperkonzentration keine Verbesserung brachte, mußte es sich um eine Kreuzreaktion des anti-IgA Antikörpers mit dem zum Absättigen der Nitrozellulose verwendeten BSA handeln. Tatsächlich konnte die unspezifische Bindung des zweiten Antikörpers durch die Verwendung von Milchpulver (1,5% Fett) 3%ig in PBS zum Absättigen und als Antikörperlösung vermieden werden.

Es zeigte sich, daß auch die nachgewiesenen IgAs nur gegen das NP-Protein gerichtet waren. Insbesondere gegen das HN- und das F-Protein, aber auch gegen die Proteine P und M gerichtete IgAs waren nicht zu finden. Zur Kontrolle wurde ein Streifen mit antiviralem Gesamtserum vom Kaninchen und ein anderes mit einem monoklonalen Antikörper gegen das HN-Protein als erstem Antikörper behandelt. Auch das antivirale Gesamtserum vom Kaninchen erkennt das HN-Protein nur schlecht. Durch den monoklonalen Antikörper kann die Anwesenheit von ausreichenden Mengen HN-Proteins auf den Streifen aber nachgewiesen werden (Abb. 8).

Die Untersuchungen auf IgAs wurden mit schon vorhandenen Seren verschiedener Tiere durchgeführt. Es kam hierbei nicht darauf an, eine Verlaufsuntersuchung anzustellen, sondern es sollte ausgeschlossen werden, daß die im Mini-Western-Blot nicht nachweisbaren Immunglobuline gegen F und HN vielleicht als IgAs vorliegen.

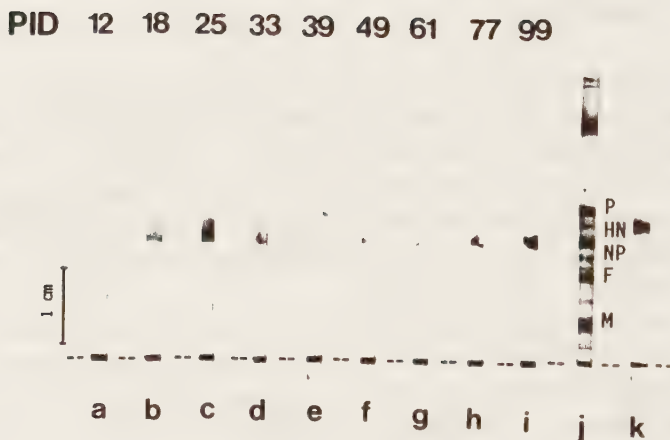


Abb. 8: IgA-Titer in Mäuseseren von intranasal mit 6/94-Virus (5000 KID) infizierten Tieren

Für die Streifchen (a)-(i) wurden je 3ul Serum, das an den oben angegebenen PIDs gewonnen worden war, eingesetzt. Streifchen (j) wurde mit 1,5ul antiviralem Gesamtserum vom Kaninchen, Streifchen (k) mit 20ul monoklonalem anti-HN Antikörpern Immuno-Peroxidase gefärbt. Die gestrichelte Linie gibt die Position des Phenolblau-Markers an.

3.2.4.1.3 IgG-Titer im Serum nach intranasaler D52-Virus Infektion

Da bisher die virusspezifischen Immunglobulintiter nur nach intranasaler Infektion mit dem 6/94-Virus bestimmt worden waren, sollte derselbe Versuch auch mit D52-Viren durchgeführt werden. Dabei sollte überprüft werden, ob die in vitro virulenteren D52-Viren vielleicht eine andere Immunantwort, insbesondere gegen die Glykoproteine F und HN, hervorrufen.

Es wurden 5 C-129 Mäuse intranasal mit D52-Viren infiziert. Die Tiere wurden einzeln gehalten, so daß die Blutproben den einzelnen Tieren zugeordnet werden können. Es zeigte sich, daß der Verlauf der Antikörpertiter innerhalb der Versuchstiergruppe sehr gleichförmig ist.

Da die erhaltenen Mini-Western-Blots denen nach intranasaler 6/94-Virus Infektion sehr ähnlich sind (Abb. 7), wurde auf eine nochmalige Darstellung verzichtet. Sowohl in der Intensität, soweit im Western-Blot zu beurteilen, als auch im zeitlichen Ablauf der IgG-Produktion ist kein Unterschied zwischen der D52-Virus Infektion und der Infektion mit 6/94-Viren zu erkennen.

Obwohl die D52-Viren in Zellkultur virulenter sind, ruft die intranasale Infektion keine stärkere Immunreaktion aus. Auch qualitativ sind keine Unterschiede in der Antikörperantwort zu erkennen. Im Verlauf der intranasalen Infektion mit D52-Viren sind ebenfalls nur IgG-Titer gegen die Proteine des Nukleokapsids NP und P, nachweisbar. Es fehlen die IgGs gegen das Matrixprotein M und die Glykoproteine F und HN.

3.2.4.1.4 IgG-Titer im Liquor nach intranasaler Infektion

Daß Sendaiviren auf natürlichen Infektionswegen ins Gehirn gelangen können, zeigt die Isolierung des 6/94-Virus aus dem menschlichen Gehirn (ter Meulen et al., 1972). Im ZNS könnten sie Permeabilitätsänderungen der Blut-Liquor-Schranke hervorrufen (Simon, 1986), oder auch eine intrathekale Immunglobulinsynthese induzieren. In diesem Fall müßten virusspezifische Antikörpertiter im Liquor deutlich erhöht sein.

Für die Feststellung von antiviralen IgG-Titern wurde nur makroskopisch nicht mit Blut verunreinigter Liquor verwendet, wovon 15ul als erster Antikörper im Mini-Western-Blot eingesetzt wurden. Da im Serum von intranasal infizierten Tieren ein guter Antikörpertiter nachgewiesen werden konnte, müßten, nach Vergleich mit der Serumverdünnungsreihe (3.2.3.3), spezifische IgG-Titer im Liquor, die deutlich über der physiologischen 1:500 Verteilung von Liquor- zu Serumantikörpern liegen, eindeutig nachgewiesen werden können. Weder im Laufe der intranasalen D52-nach noch intranasaler 6/94-Virus Infektion konnten im Liquor Antikörpertiter gegen virale Proteine gefunden werden.

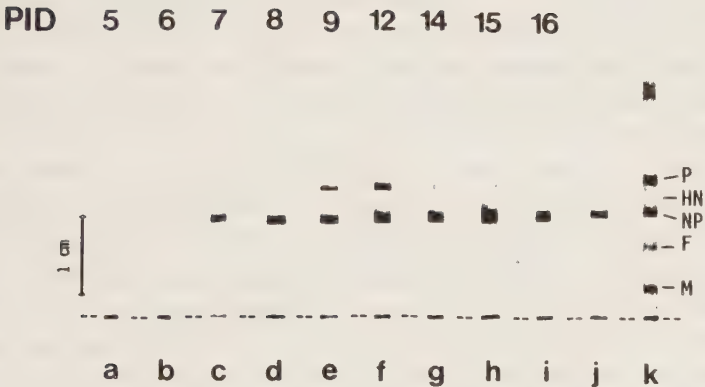
Dies läßt den Schluß zu, daß nach intranasaler Infektion entweder keine Viren ins ZNS gelangt sind, oder die virusinduzierten Schäden an der Blut-Liquor-Schranke so gering bleiben, daß es nicht zu einem vermehrten Übertritt von Antikörpern aus dem Serum in den Liquor kommt.

3.2.4.1.5 IgG-Titer in Serum und Liquor nach intracerebraler 6/94-Virus Infektion

Um das massive Vordringen von Viren in das ZNS zu simulieren wurden 5 Mäuse mit 5000 KID 6/94-Viren intracerebral infiziert (2.3.6.5). Um die Antikörpertiter exakt verfolgen zu können, wurden die Mäuse einzeln gehalten, so daß eine Zuordnung der Blut und Liquorproben zu den einzelnen Tieren möglich war. Allerdings waren auch hier die individuellen Unterschiede der Immunantwort zwischen den Tieren nur sehr gering.

Zunächst wurden auch bei den intracerebral mit 6/94-Viren infizierten Tieren die Antikörpertiter im Serum durch den Mini-Western-Blot festgestellt. Das Ergebnis zeigt, daß die Antikörpertiter im Serum der i.c. infizierten Mäuse sowohl quantitativ, wie auch qualitativ fast identisch sind mit denen nach i.n. Infektion (Abb. 9). Auch hier sind ab dem PID 6 im Serum IgG-Titer gegen das NP-Protein nachzuweisen, und nach dem PID 8-9 tauchen Immunglobuline gegen P auf. Im Mini-Western-Blot sind keine Antikörper gegen die Glykoproteine HN und F und gegen das Matrixprotein M nachzuweisen.

Eine so schnelle systemische Immunantwort ist dadurch zu erklären, daß die in den Liquor inokulierte Virussuspension nicht quantitativ dort verbleibt, sondern daß ein beträchtlicher Teil der infektiösen Viren ins Blutgefäßsystem gelangt. Mit dem Blut werden die Viren dann zu den primär affinen Geweben des Respirationstraktes transportiert und können sich dort vermehren.



**Abb. 9: IgG-Titer in Mäuseseren von intracerebral mit
5000 KID 6/94-Virus infizierten Tieren**

Für die Streifchen (a)-(i) wurden je 3ul Serum, das an den oben angegebenen PIDs gewonnen worden war, eingesetzt. Streifchen (j) wurde mit 10ul monoklonalem anti-NP Antikörpern, Streifchen (k) mit 1,5ul antiviralem Gesamtserum vom Kaninchen Immuno-Peroxidase gefärbt. Streifchen (a) und (f), (b) und (g), (c) und (h), (d) und (i) wurden mit Seren von gleichen Mäusen behandelt. Die gestrichelte Linie gibt die Position des Phenolblau-Markers an.

Durch die angewendete intracerebrale Infektionsform wurden die 6/94-Viren in den Liquor appliziert. Hier sollten sie gute Vermehrungsbedingungen finden und es war nun interessant festzustellen, ob nach dieser antigenen Stimulation im ZNS die virusspezifischen Immunglobuline im Liquor ansteigen, nachdem nach intranasaler Infektion keine Antikörper im Liquor nachweisbar waren.

Für den Mini-Western-Blot wurden 10-15ul Liquor als erster Antikörper eingesetzt. Dies ist die gesamte Menge, die sich durch eine Liquorpunktion gewinnen läßt. Tatsächlich sind nach intracerebraler 6/94-Virus Infektion in einigen Fällen sehr geringe Immunglobulintiter der Klasse G im Liquor nachzuweisen. Allerdings sind diese Signale an der Nachweis-

grenze des Mini-Western-Blots, und auch nicht bei allen untersuchten Tieren zu erkennen. Die Abschätzung der Signalstärke mittels der Serumverdünnungsreihe (3.2.3.3) ergibt, daß die Antikörpertiter, welche die schwachen Signale im Mini-Western-Blot ergeben, im Bereich der physiologischen Durchlässigkeit der Blut-Liquorschranke liegen. In allen Fällen waren die nachweisbaren Immunglobuline der Klasse G gegen das NP-Protein gerichtet.

Es zeigt sich damit, daß selbst nach massiver intracerebraler Infektion, 6/94-Viren nicht in der Lage sind, eine deutliche Erhöhung der Antikörpertiter im Liquor zu verursachen. Weiterhin ist damit erwiesen, daß die Schäden an der Blut-Liquor-Schranke nur gering bleiben. Ansonsten müßte das Verhältnis virusspezifischer Immunglobuline im Liquor zu denen im Serum deutlich über die Norm (1:500) erhöht, und damit virusspezifische Antikörper immer signifikant nachweisbar sein.

Da schon die Mäuse, die mit 6/94-Viren intracerebral infiziert worden waren, eine ausgeprägte klinische Symptomatik zeigten, wurde auf ein entsprechendes Experiment mit D52-Viren verzichtet, um die Zahl der Versuchstiere nicht unnötig zu erhöhen.

3.2.4.1.6 IgG-Titer im Serum nach intracerebraler 6/94-Virus Infektion am PID 736

Von früheren Versuchen waren noch C-129 Mäuse vorhanden, die vor mehr als zwei Jahren mit 30.000 KID 6/94-Viren intracerebral infiziert worden waren. Die Mäuse waren im Alter von 6-8 Wochen durch Injektion durch die noch weiche Schädeldecke mit 6/94-Viren infiziert worden. Damit standen Tiere zur Verfügung, die sich schon am PID 736 befanden und es war nun interessant, ob auch bei diesen Mäusen noch ein Antikörpertiter im Serum nachweisbar wäre.

Tatsächlich ließen sich bei allen vier untersuchten Tieren mit der Mini-Western-Blot Methode noch Antikörper gegen das NP-Protein, in einem Fall auch noch gegen das P-Protein nachweisen (Abb. 10 a-d). Vergleicht man die Signalstärke mit einer Verdünnungsreihe von Serumantikörpern (Abb. 6), so zeigt sich, durch Abschätzung der Signalstärke anhand einer Verdünnungsreihe (3.2.3.3), daß die Mäuse am PID 736 einen ca. 20 bis 50fach niedrigeren Antikörpertiter zeigen, als akut intracerebral infizierte Tiere. Durch dieses Ergebnis ist erwiesen, daß nach intra-

cerebraler 6/94-Virus Infektion nicht nur virale RNA im Gehirn (Koch et al., 1984), sondern auch virusspezifische IgG-Titer im Serum bei Mäusen lebenslang nachweisbar bleiben.

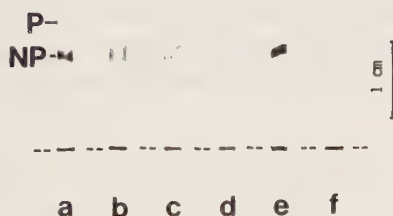


Abb. 10: Nachweis antiviraler IgG-Titer am PID 736

Die Streifen (a)-(d) wurden mit je 3ul Serum als erstem Antikörper Immuno-Peroxidase gefärbt. (e) wurde mit 10ul eines gegen das NP-Protein gerichteten monoklonalen Antikörpers, (f) mit dem Serum eines uninfizierten Tieres Immuno-Peroxidase gefärbt.

Zwischenzusammenfassung

Bei der Untersuchung von C-129 Mäusen auf virusproteinspezifische Antikörper im Serum und Liquor hat sich gezeigt, daß nach intranasaler Infektion mit 6/94- und D52-Viren, sowie nach intracerebraler Infektion mit 6/94-Viren die Immunglobulinantwort im Serum sowohl quantitativ als auch qualitativ nahezu gleich sind. Erstaunlich ist die Tatsache, daß durch den Mini-Western-Blot immer nur Antikörper gegen die Nukleokapsidproteine P und NP zu finden sind. Durch die Untersuchung von Mäusen, die vor über zwei Jahren intracerebral mit 6/94-Viren infiziert worden waren, konnte nachgewiesen werden, daß die virusspezifischen Serumantikörpertiter lebenslang vorhanden sind. Im Liquor konnte nur nach intracerebraler 6/94-Virus Infektion ein sehr geringer IgG-Titer gegen das NP-Protein nachgewiesen werden, der sich noch im Bereich der natürlichen Durchlässigkeit der Blut-Liquor-Schranke bewegt.

3.2.4.2 Untersuchung von Lewis-Ratten

Um festzustellen, ob sich die Lewis-Ratten in ihrer Empfänglichkeit für Sendaiviren und in der Antikörperantwort von C-129 Mäusen unterscheiden, vielleicht eine Virämie zeigen und eventuell eine Symptomatik erkennen lassen, die auf Autoimmunerkrankungen hinweisen, wurden auch je 5 Lewis-Ratten mit D52- und 6/94-Viren intranasal und intracerebral infiziert. Weiterhin war es auch günstig größere Mengen Serum und insbesondere mehr Liquor pro Tier und Punktion zur Verfügung zu haben. Durch die größere Blutmenge der Ratten (ca.15ml) ist es außerdem möglich jeden zweiten Tag eine ausreichende Serummenge von einem Tier zu gewinnen, und so das Raster der Antikörperuntersuchungen an einem Tier dichter zu halten.

3.2.4.2.1 Serum IgG-Titer nach intranasaler D52-Virus Infektion

Die fünf intranasal mit D52-Viren infizierten Lewis-Ratten wurden markiert, so daß die Serum und Liquorproben immer einem bestimmten Tier zugeordnet werden konnten. So war es möglich den Verlauf der Antikörpertiter auch an ein und demselben Tier zu verfolgen. Allerdings erwiesen sich die individuellen Unterschiede innerhalb einer Versuchstiergruppe nur als sehr gering. Eine Ratte wurde als Kontrolltier gehalten, um eine eventuelle Verfälschung der Krankheits Symptome durch die Narkosen oder die Blut- und Liquorgewinnungstechnik zu erkennen.

Nach intranasaler D52-Virus Infektion sind, wie auch bei den Mäuseinfektionen, ab dem PID 7 IgG-Titer gegen das NP-Protein und ab dem PID 10 gegen das P-Protein zu erkennen. Auch im Rattenserum sind mit dem Mini-Western-Blot keine Antikörper gegen die Glykoproteine HN und F sowie gegen das Matrixprotein M festzustellen. Um zu zeigen, daß diese Proteine auf den verwendeten Nitrozellulosestreifen überhaupt vorhanden waren und auch durch passende Antikörper erkannt werden, wurde ein Streifen mit India Ink angefärbt (Abb. 11 a) und ein anderes mit antiviralem Gesamtserum vom Kaninchen (Abb. 11 m) Immuno-Peroxidase gefärbt.

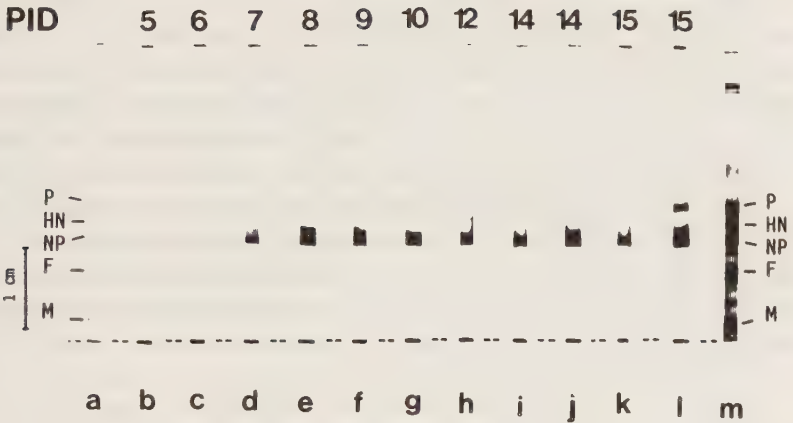


Abb. 11: IgG-Titer in Rattenseren von intranasal mit 50.000 KID D52-Viren infizierten Tieren.

Für die Streifchen (b)-(l) wurden je 3ul Serum (1:170 verdünnt), das an den oben angegebenen PIDs gewonnen worden war, als erster Antikörper in der Immuno-Peroxidase Färbung eingesetzt. Als zweiter Antikörper wurde ein anti-Ratten-IgG peroxidasegekoppelt (Dakopatts) in der Verdünnung 1:500 verwendet. Streifchen (b), (d), (f) und (l) stammen vom gleichen Tier, ebenso Streifchen (c), (e) und (j). Als Kontrolle wurde Streifchen (a) mit India Ink angefärbt, Streifchen (m) mit 1,5ul antiviralem Gesamtserum vom Kaninchen Immuno-Peroxidase gefärbt. Die gestrichelte Linie gibt die Position des Phenolblau-Markers an.

3.2.4.2.2 Serum IgG-Titer nach intranasaler 6/94-Virus Infektion

Die fünf Ratten, die intranasal mit 6/94-Viren infiziert worden waren, wurden ebenfalls markiert, wie unter 3.2.4.2.1 beschrieben. Die Antikörperantwort gegen das 6/94-Virus, eine ts-Mutante, erfolgt sogar noch schneller und intensiver, als nach Infektion mit dem Wildtypvirus

D52 (Abb. 12). Bereits am PID 6 ist ein deutlicher IgG-Titer gegen das NP-Protein nachweisbar und auch der IgG-Titer gegen das P-Protein erscheint schon am PID 7 und damit früher als nach D52-Virus Infektion. Auch erscheint die Immunantwort gegen das P-Protein nach 6/94-Virus Infektion stärker als nach D52-Virus Infektion. Offensichtlich ist das 6/94-Virus besser an die Gewebe des Respirationstraktes von Ratten adaptiert, als der Wildtyp D52. Die individuellen Unterschiede in der Immunantwort zwischen den einzelnen Tieren sind nur gering.

Um zu zeigen, daß sich das HN-Protein in ausreichenden Mengen auf den Streifchen befindet, wurde ein Streifchen mit einem monoklonalen Antikörper gegen dieses Protein (Abb. 12 k) Immuno-Peroxidase gefärbt. Ein anderes Streifchen wurde mit antiviralem Gesamtserum vom Kaninchen Immuno-Peroxidase gefärbt (Abb. 12 l).



Abb. 12: IgG-Titer in Rattenserum von intranasal mit 50.000 KID 6/94-Virus infizierten Tieren.

Für die Streifchen (a)-(j) wurden je 3ul Serum, das an den oben angegebenen PIDs gewonnen worden war, eingesetzt (wie Abb. 11). Die Streifchen (a), (c), (e), (g) und (i) bzw. (b), (d), (f), (h) und (j) stammen von den gleichen Tieren. Als Positivkontrolle wurde Streifchen (k) mit 20ul monoklonalem Antikörper gegen das HN-Protein, Streifchen (l) mit 1,5ul antiviralem Gesamtserum vom Kaninchen Immuno-Peroxidase gefärbt. Die gestrichelte Linie gibt die Position des Phenolblau-Markers an.

3.2.4.2.3 Serum IgG-Titer nach intracerebraler D52-Virus Infektion

Die fünf Lewis-Ratten, die intracerebral mit D52-Viren infiziert worden waren, wurden markiert wie unter 3.2.4.2.1 beschrieben. Die in Abb. 13 gezeigten Mini-Western-Blot Streifchen wurden alternierend mit den Seren von zwei infizierten Tieren behandelt.

Auch nach intracerebraler Infektion mit D52-Viren kommt es zu einer intensiven systemischen Immunantwort. Nach Inokulation von D52-Viren in den Liquor der Lewis-Ratten, ist schon am PID 6 ein deutlicher IgG-Titer gegen das NP-Protein des Nukleokapsids erkennbar. Am PID 7 erscheint dann auch die P-Bande im Western-Blot, d.h. es sind Antikörper gegen dieses Protein im Serum vorhanden. Beide Titer steigen sehr schnell an und bleiben dann im Untersuchungszeitraum von 16 Tagen, soweit der Western-Blot diese Beurteilung zuläßt, konstant (Abb. 13). Auch nach dieser Infektionsform konnten keine Antikörper gegen HN, F und M nachgewiesen werden. Die Immunantwort ist bei allen Tieren gleich. Die schnelle systemische Antikörperantwort nach intracerebraler Infektion läßt sich dadurch erklären, daß infektionstechnisch sicherlich nicht alle inokulierten Viren im ZNS bleiben, sondern ein großer Teil auch ins Blut gelangt.

Als Positivkontrolle für die Glykoproteine wurde ein Streifchen mit einem monoklonalen Antikörper behandelt, der die Glykoepitope von HN und F erkennt (Abb. 13 k). Ein weiterer Streifen wurde mit einem antiviralen Gesamtserum vom Kaninchen Immuno-Peroxidase gefärbt (Abb. 13 l).

PID 5 6 7 8 9 12 13 14 15 16



Abb. 13: IgG-Titer in Rattenserum von intracerebral mit 50.000 KID D52-Viren infizierten Tieren

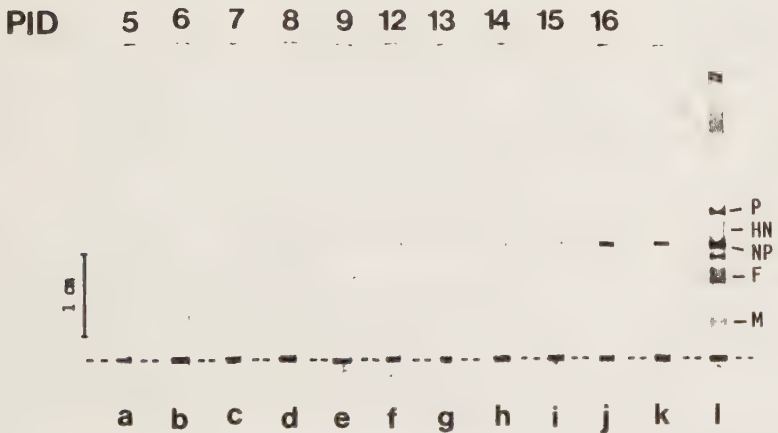
Für die Streifchen (a)-(j) wurden je 3ul Serum, das an den oben angegebenen PIDs gewonnen worden war, eingesetzt (wie Abb. 11). Die Streifchen (a), (c), (e), (g) und (i) bzw. (b), (d), (f), (h) und (j) stammen von den gleichen Tieren. Als Positivkontrolle wurde Streifchen (k) mit 30ul monoklonalem Antikörper gegen die Glykoepitope der Proteine HN und F, Streifchen (l) mit 1,5ul antiviralem Gesamtserum vom Kaninchen Immuno-Peroxidase gefärbt. Die gestrichelte Linie gibt die Position des Phenolblau-Markers an.

3.2.4.2.4 Serum IgG-Titer nach intracerebraler 6/94-Virus Infektion

Auch die 5 intracerebral mit 6/94-Viren infizierten Ratten wurden markiert, um den Verlauf der Antikörpertiter an einem Tier verfolgen zu können. Die Antikörperantwort im Serum auf die intracerebrale Infektion von Lewis-Rattten mit 6/94-Viren ist, abgeschätzt durch die Serumverdünnungsreihe (3.2.3.3), ungefähr um den Faktor 10 schwächer, als nach intranasaler Infektion von Ratten und ebenfalls um den Faktor 10 schwächer als die Immunantwort der C-129 Mäuse auf die intracerebrale

6/94-Virus Infektion (Abb. 14). Erst nach 12 Tagen läßt sich ein IgG-Titer gegen das NP-Protein nachweisen, der dann bis zum PID 16 ansteigt. Gegen andere Proteine sind im Mini-Western-Blot keine Antikörper festzustellen. Auch hier zeigt sich, daß die individuellen Schwankungen innerhalb der Versuchstiergruppe nur gering sind.

Offensichtlich hat die ts-Mutante bei dieser Infektionsform einen deutlichen Vermehrungsnachteil gegenüber dem Wildtyp. Dadurch fehlt die exponentielle Antigenzunahme am Anfang der Infektion, und dadurch bleibt auch die Immunantwort nur gering.



**Abb. 14: IgG-Titer in Rattenserum von intracerebral mit
50.000 KID 6/94-Virus infizierten Tieren**

Für die Streifen (a)-(j) wurden je 3 µl Serum, das an den oben angegebenen PIDs gewonnen worden war, eingesetzt (wie Abb. 11). Die Streifen (a), (c), (e), (g) und (i) bzw. (b), (d), (f), (h) und (j) stammen von den gleichen Tieren. Als Positivkontrolle wurde Streifen (k) mit 10 µl monoklonalem Antikörper gegen das NP-Protein, Streifen (l) mit 1,5 µl antiviralem Gesamtserum vom Kaninchen Immuno-Peroxidase gefärbt. Die gestrichelte Linie gibt die Position des Phenolblau-Markers an.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß sich die Immunantwort im Serum von C-129 Mäusen und Lewis-Ratten nach Sendaivirus Infektion, bei der Untersuchung im Mini-Western-Blot, hauptsächlich dadurch unterscheidet, daß nach intracerebraler Infektion mit 6/94-Viren die Immunglobulintiter im Serum der Lewis-Ratten ca. um den Faktor 10 niedriger als bei den C-129 Mäusen sind.

3.2.4.2.5 IgG-Titer im Liquor

Die Blutentnahme bei den Lewis-Ratten konnte ohne Schwierigkeiten jeden zweiten Tag erfolgen, während zwischen zwei Liquorpunktionen mindestens 10 Tage liegen sollten. Daher war eine engmaschige Verlaufsuntersuchung an einem Tier nicht möglich. Da bei der Untersuchung der Serumantikörper keine größeren Schwankungen der Titer innerhalb einer Versuchstiergruppe feststellbar waren, konnte davon ausgegangen werden, daß auch die Liquorantikörpertiter keine größeren Schwankungen aufweisen. Daher wurden in der Abb. 15 die Ergebnisse, die mit den Liquores verschiedener Tiere aus einer Infektionsgruppe erhalten wurden, wiedergegeben. Untersucht wurden Liquores bis zum PID 22.

Da nur geringe virusspezifische Antikörpertiter im Liquor erwartet werden konnten, wurden die Liquores der Ratten in einer 10fach höheren Konzentration für den Mini-Western-Blot eingesetzt, als die Seren. Dieser Faktor 10 ist bei der Beurteilung der Signalstärke im Western-Blot zu berücksichtigen. Je fünf Liquorproben pro Infektionsform (6/94-Virus intranasal und intracerebral; D52-Virus intranasal und intracerebral) wurden untersucht.

Weder nach intracerebraler 6/94-Virus Infektion (Abb. 15 a-e) noch nach intranasaler D52-Virus Infektion (Abb. 15 s-w) konnten virusspezifischen Antikörper im Liquor gefunden werden. Im Liquor der intranasal mit 6/94-Virus infizierten Tiere (Abb. 15 g-k) ließen sich am PID 16 und 22 sehr niedrige IgG-Titer gegen das NP-Protein nachweisen. Beim Vergleich mit der Serumverdünnungsreihe (Abb. 6) läßt sich feststellen, daß das Verhältnis virusspezifischer IgG-Titer im Liquor zu denen im Serum ca. 1:500 bis 1:1000 beträgt. Damit befindet es sich in einem Bereich, der sich durch Diffusion der Antikörper durch die intakte Blut-Liquor-Schranke erklären läßt, insbesondere, da nach intranasaler 6/94-Virus

Infektion auch die virusspezifischen Serumantikörper besonders hohe Titer erreichten.

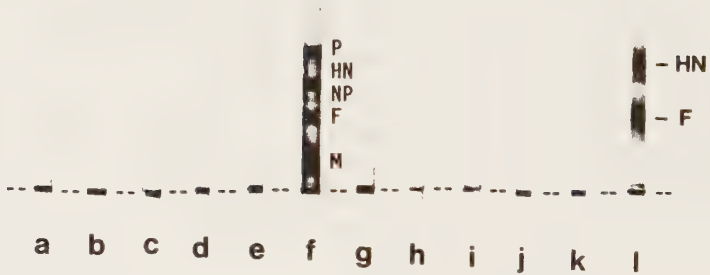
Deutlich erhöhte Antikörpertiter lassen sich nach intracerebraler Infektion mit D52-Viren im Liquor nachweisen (Abb. 15 m-q). Im Vergleich mit der Antikörperantwort im Serum, die bereits am PID 6 nachweisbar ist, erscheint der Anstieg der IgG-Titer im Liquor verzögert. Erst am PID 12 sind IgGs gegen das NP-Protein festzustellen, wobei sich die Signale bis zum PID 22 noch verstärken. Gegen andere virale Strukturproteine ließen sich keine Immunglobuline im Liquor nachweisen. Das Verhältnis anti-NP spezifischer Immunglobuline im Liquor zu solchen im Serum ist auf Werte um 1:50 bis 1:100 angehoben.

Abb. 15 (Seite 78): IgG-Titer in den Liquores von Lewis-Ratten

(a)-(e)	50.000 KID	6/94-Virus intracerebral
(g)-(k)	50.000 KID	6/94-Virus intranasal
(m)-(q)	50.000 KID	D52-Virus intracerebral
(s)-(w)	50.000 KID	D52-Virus intranasal

Streifchen (a)-(e), (g)-(k), (m)-(q) und (s)-(w) wurden mit je 30ul Liquor (1:15 verdünnt) als erstem Antikörper Immuno-Peroxidase gefärbt. Als Kontrolle wurde Streifchen (f) mit 1,5ul antiviralem Gesamtserum, Streifchen (l) mit 30ul monoklonalem Antikörper gegen die Glykoepitope, Streifchen (r) mit 10ul monoklonalem Antikörper gegen das NP-Protein und Streifchen (x) mit 20ul monoklonalem Antikörper gegen das HN-Protein Immuno-Peroxidase gefärbt. Die gestrichelte Linie gibt die Position des Phenolblau-Markers an.

PID 7 12 15 16 22 7 8 15 16 22



PID 7 12 15 16 22 7 8 15 16 22



Abb. 15: Beschreibung Seite 77.

Zwischenzusammenfassung

Der Mini-Western-Blot erwies sich als geeignet für die Detektion virusproteinspezifischer IgG-Titer im Liquor. Auch die serienmäßige Untersuchung von Serumproben mittels dieser Methode ist problemlos und zuverlässig. Auffällig bei der Untersuchung der infizierten Lewis-Ratten waren die im Vergleich zu den C-129 Mäusen geringen Antikörpertiter im Serum nach intracerebraler Infektion mit 6/94-Viren. Im Liquor der Lewis-Ratten konnte nur nach intracerebraler Infektion mit D52-Viren ein deutlicher Anstieg der virusspezifischen Antikörper festgestellt werden.

Allerdings konnten durch den Mini-Western-Blot im Serum der Lewis-Ratten, wie auch bei den Mäusen in keinem Fall Antikörper gegen die Glykoproteine F und HN und gegen das Matrixprotein M nachgewiesen werden. Für das M-Protein ist das erklärbar, weil auch bei SSPE-Kranken keine oder nur sehr geringe Antikörpertiter gegen dieses Protein nachgewiesen werden können (Ohara et al., 1985). Die Antikörper gegen das F-Protein und das HN-Protein sollten jedoch essentiell bei der Abwehr einer Virusinfektion und deshalb auch im Serum vorhanden sein.

In der Literatur sind immer wieder hämagglutinationshemmende Antikörper im Verlauf von Sendaivirus Infektionen gemessen worden (Garlinghouse et al., 1987). Antikörper, welche die hämagglutinierenden Eigenschaften von Viren hemmen, sollten native virale Oberflächenantigene erkennen und blockieren. Die Tatsache, daß der HAH-Test Antikörper gegen die Oberflächenproteine detektiert steht im Widerspruch zu den bisherigen, durch den Mini-Western-Blot erhaltenen Ergebnissen, die keine Antikörper gegen HN und F nachweisen. Daher sollten zunächst die Literaturdaten überprüft werden.

3.2.5 Hämagglutinationshemmende Antikörper in Rattenserum

Mit dem Hämagglutinationshemmungs-Test (2.3.3.3) können hämagglutinationshemmende Antikörper im Serum festgestellt werden. Das sind Antikörper, welche die Oberflächenproteine des Virions blockieren. Dadurch wird die Hämagglutination direkt, durch Blockade des hämagglutinierenden Epitops des HN-Proteins, und sterisch durch Binden an benachbarte Epitope behindert. Falls Antikörper gegen das HN-Protein im Serum vorhanden sein sollten, wären sie im HAH-Test nachweisbar.

Die Serumproben von je einer Lewis-Ratte, die mit D52- und 6/94-Virus, intranasal bzw. intracerebral infiziert worden war, wurden untersucht. Zur Testdurchführung wurde eine Serumverdünnungsreihe angelegt und ausgewertet, ab welcher Verdünnungsstufe eine sehr genau auf 4HA eingestellte Virussuspension eine 1%ige humane O-Erythrozyten Lösung nicht mehr agglutiniert, sondern durch das zugegebene Serum daran gehindert wird (2.3.3.3). Der reziproke Wert der Serumverdünnungsstufe wurde dann als HAH-Titer an der y-Achse von Abb. 16 aufgetragen. Von jedem Infektionstyp wurden an den PIDs 6, 8, 12, 14, 16 und 29 diese HAH-Titer, um Pipettierfehler zu minimieren in einer Doppelbestimmung, festgestellt. Auf jeder HAH-Platte wurde die verwendete Virussuspension gleichzeitig nochmals auf ihre hämagglutinierenden Eigenschaften hin untersucht, und kontrolliert, daß die Erythrozytensuspension ohne Zugabe von Viren nicht hämagglutiniert. Als Negativkontrolle wurde das Serum eines uninfizierten Tieres verwendet. Als Positivkontrolle diente ein anti-Sendai Gesamtserum (Behring).

Die im HAH-Test nachweisbaren Antikörpertiter steigen ab dem PID 6 an (Abb. 16). Dies stimmt mit den im Mini-Western-Blot erhaltenen Ergebnissen für die Antikörpertiter gegen das P- und NP-Protein überein. Der HAH-Titer ist nach intranasaler Infektion mit D52-Viren am höchsten, die Titer bei den anderen Infektionsformen unterscheiden sich nur geringfügig. In jedem Fall lassen sich, im Gegensatz zu den Ergebnissen des Mini-Western-Blots, durch den HAH-Test Antikörper gegen Oberflächen-epitope des Virions nachweisen.

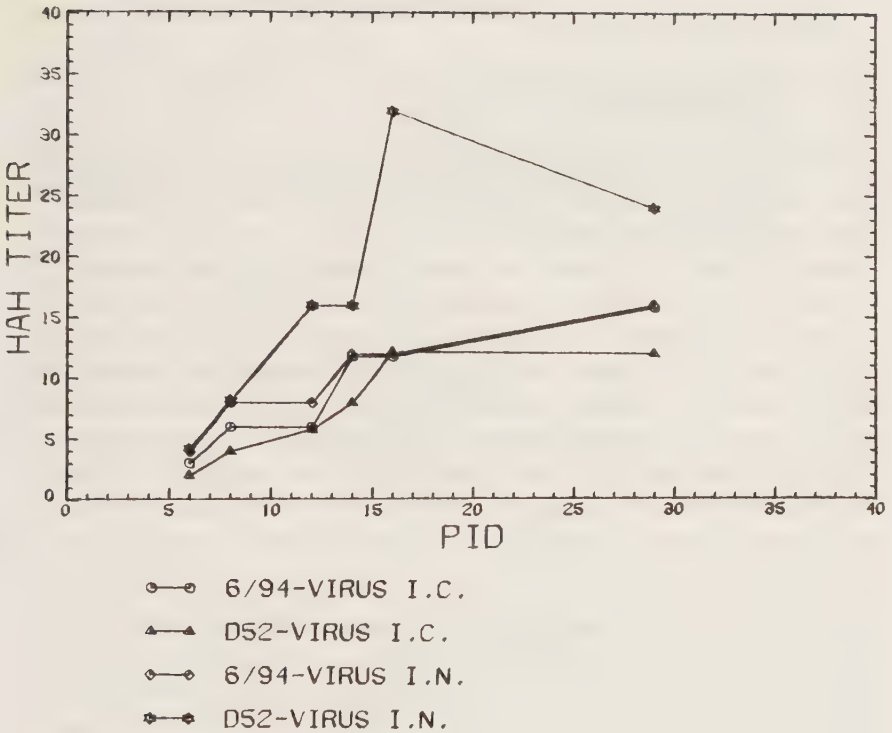


Abb. 16 : HAH-Titer von Rattenserum

Von je einer Ratte, die mit 50.000 KID D52- und 6/94-Virus, intranasal (I.N.) und intracerebral (I.C.) infiziert worden waren, wurde an verschiedenen Postinfektionstagen (PID) der Serum HAH-Titer gemessen. Hierzu wurde in einer Mikrotiterplatte eine Serumverdünnungsreihe angelegt, je Vertiefung 4 hämagglutinierende Einheiten 6/94-Virus zugegeben und die Hemmung der Hämagglutination durch 1%ige humane O-Erythrozyten-suspension sichtbar gemacht. Die so durch eine Doppelbestimmung festgestellten Titer wurden gemittelt und auf der y-Achse gegen die PIDs aufgetragen.

3.2.6 Antikörpertiter gegen die einzelnen Virusproteine ermittelt durch den ELISA

3.2.6.1 Proteinreinigung

Da im Mini-Western-Blot keine Antikörper gegen die Glykoproteine F und HN nachgewiesen werden konnten, der HAH-Test aber Titer hämagglutinationshemmender Antikörper zeigte, sollten die bisher gewonnenen Ergebnisse durch ELISAs gegen gereinigte Proteine nachgeprüft werden.

Der erste Schritt hierfür war die mehrfache Reinigung der SDS-denaturierten Virusproteine (P, HN, NP, F und M) mit Hilfe der präoperativen SDS-Polyacrylgelelektrophorese (2.3.4.2). Zwei schmale Randstreifen des Geles wurden mit Coomassie gefärbt (2.3.4.4.1), und die Proteinbanden anhand dieser gefärbten Randstreifen zugeordnet und ausgeschnitten. Die Proteine wurden durch Elektroelution (2.3.4.5) aus den Gelstreifen extrahiert und die Proteinkonzentration in den Eluaten durch den Schaffner-Weißmann-Test (2.3.4.6) in einer dreifach-Bestimmung festgestellt.

3.2.6.2 Reinheit der isolierten Proteine

Die Reinheit der so gewonnenen denaturierten Virusproteine wurde zunächst mit Hilfe des Phast-Systems überprüft: die Proteine wurden dabei, nach der Elektrophorese, mittels der Silberfärbung nach Heukeshoven (2.3.4.4.2) sichtbar gemacht (Abb. 17).

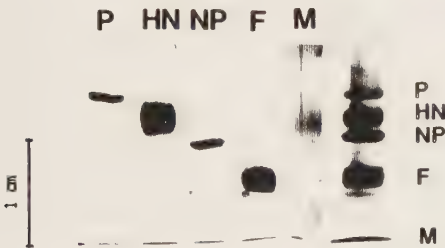
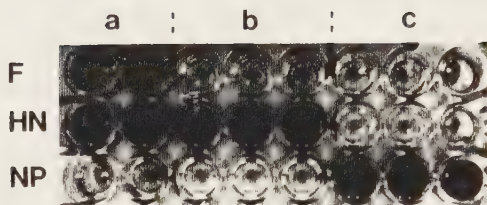


Abb. 17: Isolierte Virusproteine im Phast-System

Die über präparative SDS-PAGE gereinigten Virusproteine wurden in einem 6,5%igem Gel und anschließender Silberfärbung auf ihre Reinheit überprüft. Das M-Protein läuft mit dem Phenolblaumarker und wird daher nicht dargestellt. In der rechten Spur ist zum Vergleich ein Marker mit allen viralen Proteinen aufgetragen.

Die gereinigten Virusproteine wurde weiterhin auf Kreuzreaktionen im ELISA mit vorhandenen monoklonalen Antikörpern gegen das HN-Protein, gegen die Glyko-Epitope von HN-Protein und F-Protein und gegen das NP-Protein getestet (Abb. 18). Falls im ELISA Antikörpertiter gegen HN und F nachweisbar wären, mußte sicher sein, daß solche Titer nicht durch eine Verunreinigung dieser Proteine mit NP herrühren. Dies war insbesondere wichtig, da der Mini-Western-Blot das Vorhandensein hoher anti-NP Titer gezeigt hatte und daher schon eine geringe NP-Verunreinigung die Ergebnisse des ELISAs verfälschen könnte. Wie der Versuch zeigt sind Restverunreinigungen zu vernachlässigen (Abb. 18).



	a	b	c
F	2,5	0,08	0,06
HN	2,3	2,6	0,03
NP	0,15	0,019	2,6

Abb. 18: Gereinigte virale Proteine im ELISA

Um die gereinigten Viruproteine auch immunologisch auf ihre Reinheit zu überprüfen, wurden die entsprechenden horizontalen Reihen, mit je 300ng des genannten Proteins beschichtet. Die mit (a) bezeichneten Vertiefungen wurden mit einem monoklonalen Antikörper, der die Glykoepitope erkennt, (b) mit einem anti-HN monoklonalem, (c) mit einem anti-NP monoklonalem Antikörper Immuno-Peroxidase gefärbt.

3.2.6.3 IgG-Titer gegen einzelne Virusproteine im Serum von Ratten

Seren von Ratten, die mit D52- und 6/94-Virus (50.000 KID/Tier), intranasal und intracerebral infiziert und im Mini-Western-Blot bereits untersucht worden waren (3.2.4.2), wurden nun im ELISA ausgewertet. Von jedem Infektionstyp wurden die Seren von zwei Tieren im Verlauf der Infektion untersucht. Da der Verlauf der Antikörperantwort gegen die einzelnen Proteine innerhalb einer Versuchstiergruppe nur geringen individuellen Schwankungen unterliegt, konnten die einzelnen ermittelten OD-Werte von zwei Tieren pro Infektionsform in eine Kurve zusammengefaßt werden. Die Serumproben von PID 5 bis PID 29 wurden gegen die 5 gereinigten Proteine P, HN, NP, F und M im ELISA getestet. Als Kontrolle

diente ein antivirales Gesamtserum vom Kaninchen, das bei einer Verdünnung von 1:100 die OD₄₀₅-Werte der Tabelle 2 erreichte. Das Ergebnis zeigt, daß alle viralen Proteine durch das Serum eines immunisierten Kaninchens im ELISA gut erkannt werden.

Tabelle 2 : OD₄₀₅-Werte* im ELISA (2.3.5.1) mit dem Serum eines immunisierten Kaninchens.

Protein	Serum- verdünnung	OD ₄₀₅
P	1:100	1,3
HN	1:100	1,5
NP	1:100	2,0
F	1:100	2,2
M	1:100	1,3

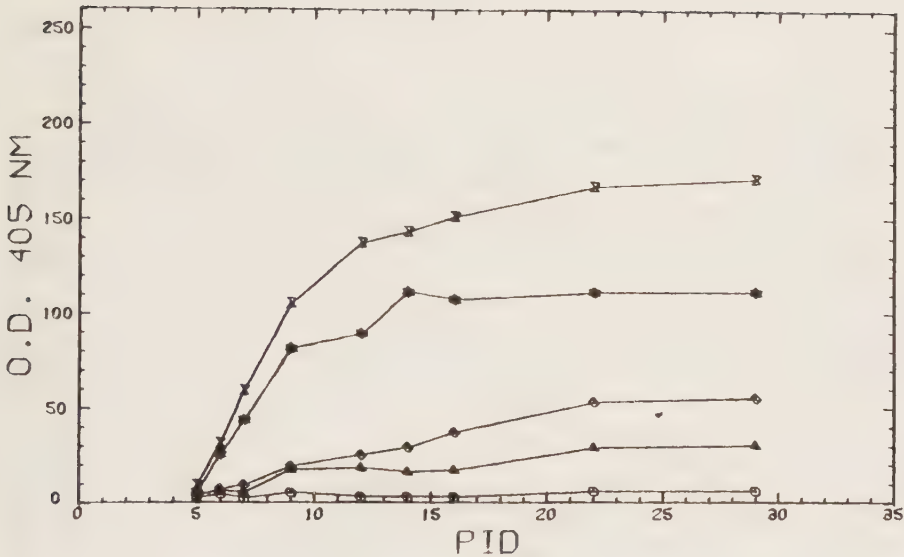
* In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden je 300 ng gereinigte virale Proteine gebunden. Als erster Antikörper wurde eine Serumverdünnungsreihe mit einem antiviralen Gesamtserum vom Kaninchen angelegt. Die OD₄₀₅ wurde nach Zugabe eines zweiten, Peroxidase gekoppelten Antikörpers und einer Enzymreaktion gemessen.

Die gereinigten Proteine wurden für den eigentlichen Versuch im Überschuß (300ng/ Vertiefung) eingesetzt. Damit hat die Proteinkonzentration keinen Einfluß auf die ermittelten OD-Werte. Sonst wurde der ELISA wie unter 2.3.5.1 beschrieben durchgeführt. Wichtig ist, daß die Einwirkzeit der Peroxidase auf die ABTS-Lösung in jedem Test genau 30 Minuten beträgt, um die OD-Werte miteinander vergleichen zu können.

Die Abb. 19, 20, 21 und 22 zeigen das Ergebnis dieses Versuchs. Man erkennt, daß die Produktion von IgGs ab dem PID 6 stark ansteigt, und ca. am PID 10 bis 15 Maximalwerte erreicht. Wie der Mini-Western-Blot zeigt auch der ELISA die stärksten Signale gegen das NP-Protein, d.h. erstaunlicherweise werden gegen ein Protein des Nukleokapsids die meisten Antikörper gebildet. Gegen die Proteine HN und F sind im Gegensatz zu den Ergebnissen des Mini-Western-Blots, durch den ELISA deutliche

IgG-Titer meßbar. Gegen das P-Protein lassen sich sowohl im Mini-Western-Blot wie auch im proteinspezifischen ELISA Immunglobuline der Klasse G nachweisen. Allerdings sind die Titer im ELISA verglichen mit den Western-Blot Signalen niedriger. Offensichtlich ist für den Nachweis von Antikörpern gegen das P-Protein die Mini-Western-Blot Technik geeigneter als der ELISA. IgGs, die gegen das M-Protein gerichtet sind, kommen wenn überhaupt, nur in einem Umfang vor, der unter der Nachweisgrenze des ELISAs liegt. In diesem Punkt ergibt der Mini-Western-Blot das gleiche negative Ergebnis wie der ELISA.

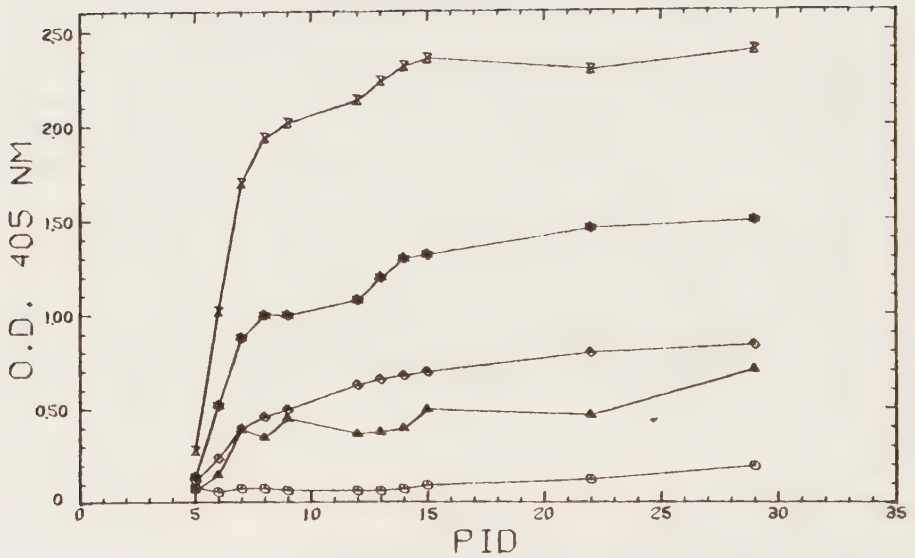
Die Quantität der Antikörperantwort auf die verschiedenen Infektionsformen die im ELISA ermittelt wurde stimmt recht gut mit den Ergebnissen des Mini-Western-Blots überein. Auch im ELISA sind die Antikörpertiter nach intranasaler 6/94-Virus Infektion der Ratten am stärksten, nach intracerebraler D52-Virus Infektion am schwächsten.



- SERUM IGG GEGEN M-PROTEIN
- ▲—▲ SERUM IGG GEGEN P-PROTEIN
- ◇—◇ SERUM IGG GEGEN HN-PROTEIN
- SERUM IGG GEGEN F-PROTEIN
- ×—× SERUM IGG GEGEN NP-PROTEIN

Abb. 19: ELISA-Titer von Rattenserum, D52-Viren i.n.

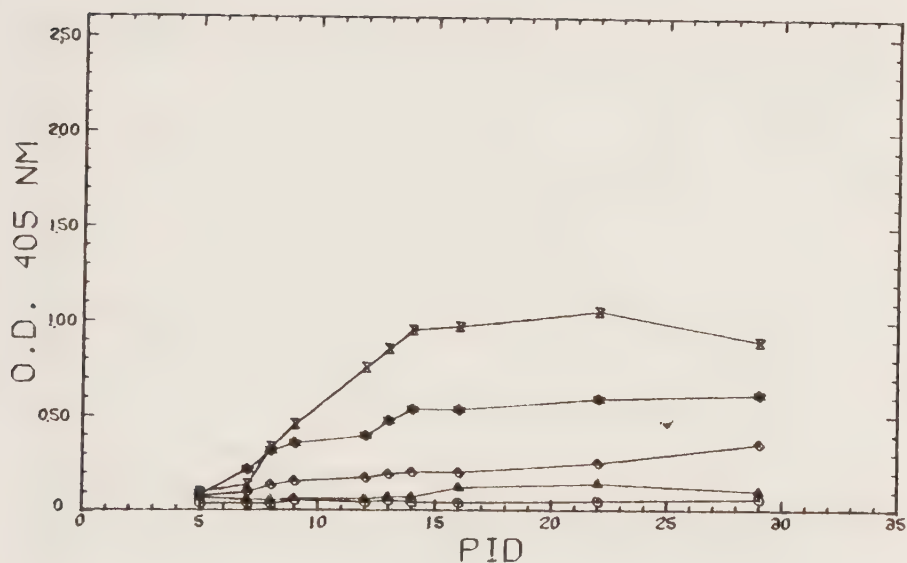
Die ELISA-Titer im Serum von Ratten, die intranasal mit 50.000 KID D52-Viren infiziert worden waren, wurden folgendermaßen bestimmt: Je 300ng gereinigtes Virusprotein wurden pro Vertiefung in eine Mikrotiterplatte gebunden. Als erster Antikörper wurde in Form einer Verdünnungsreihe das zu untersuchende Serum zugegeben und gebundene Antikörper mit Hilfe peroxidasegekoppelter anti-Ratten IgG Antikörper in einer Enzymreaktion nachgewiesen. Der IgG-Titer gegen die einzelnen viralen Proteine wurde durch die OD₄₀₅ der 1:100 Verdünnung ermittelt.



- SERUM IGG GEGEN M-PROTEIN
- ▲—▲ SERUM IGG GEGEN P-PROTEIN
- ◇—◇ SERUM IGG GEGEN HN-PROTEIN
- ◆—◆ SERUM IGG GEGEN F-PROTEIN
- ×—× SERUM IGG GEGEN NP-PROTEIN

Abb. 20: ELISA-Titer von Rattenserum, 6/94-Virus i.n.

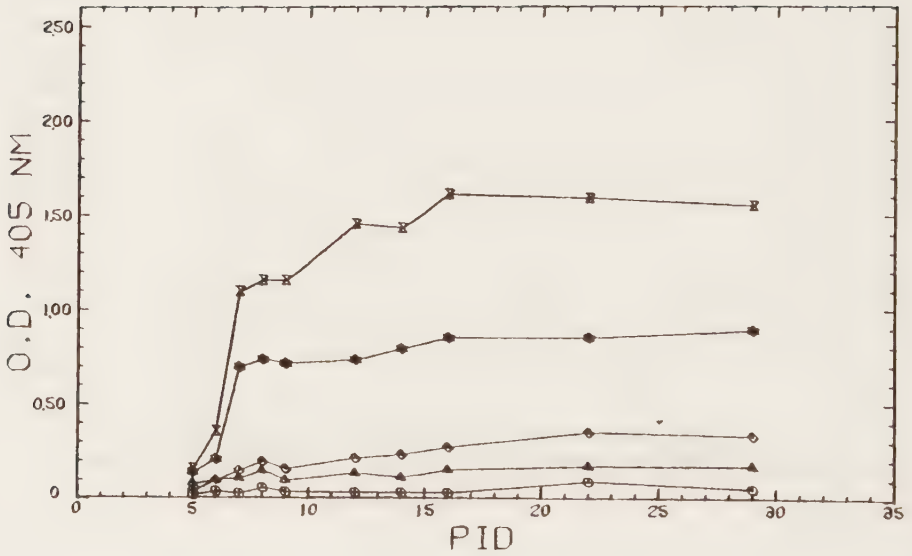
ELISA-Titer im Serum von Ratten, die intranasal mit 50.000 KID 6/94-Virus infiziert worden waren, ermittelt wie in Abb. 19 beschrieben.



- SERUM IGG GEGEN M-PROTEIN
- △—△ SERUM IGG GEGEN P-PROTEIN
- ◇—◇ SERUM IGG GEGEN HN-PROTEIN
- SERUM IGG GEGEN F-PROTEIN
- ×—× SERUM IGG GEGEN NP-PROTEIN

Abb. 21: ELISA-Titer von Rattenserum, 6/94-Virus i.c.

ELISA-Titer im Serum von Ratten, die intracerebral mit 50.000 KID 6/94-Virus infiziert worden waren, ermittelt wie in Abb. 19 beschrieben.



- SERUM IGG GEGEN M-PROTEIN
- ▲—▲ SERUM IGG GEGEN P-PROTEIN
- ◊—◊ SERUM IGG GEGEN HN-PROTEIN
- SERUM IGG GEGEN F-PROTEIN
- x—x SERUM IGG GEGEN NP-PROTEIN

Abb. 22: ELISA-Titer von Rattenserum, D52-Viren i.c.

ELISA-Titer im Serum von Ratten, die intracerebral mit 50.000 KID D52-Viren infiziert worden waren, ermittelt wie in Abb. 19 beschrieben.

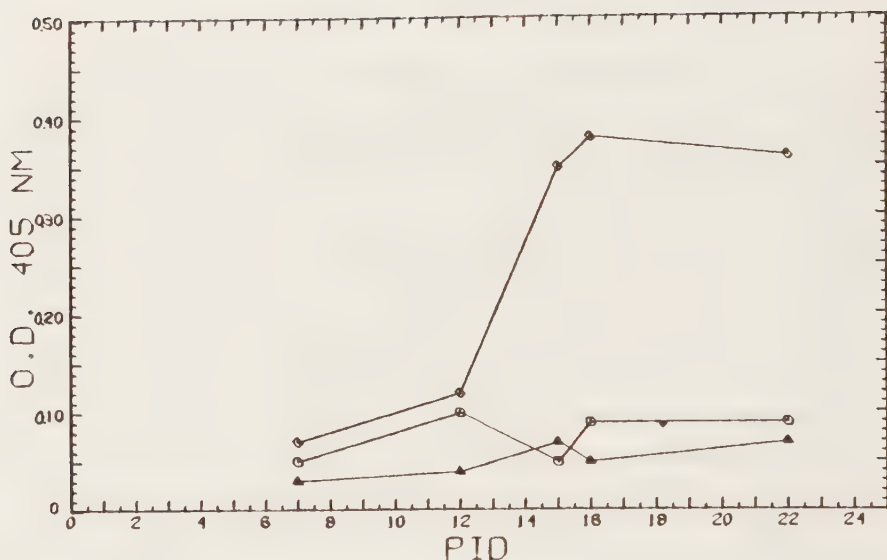
3.2.6.4 IgG-Titer im Liquor von Ratten

Nachdem im Mini-Western-Blot das Vorhandensein geringer IgG-Titer im Liquor infizierter Tiere nachgewiesen wurde, sollte dies auch im ELISA gegen gereinigte Virusproteine nachvollzogen werden. Hierfür wurde der ELISA durchgeführt wie unter 2.3.5.1 beschrieben, nur mit dem Unterschied, daß die Verdünnungsreihe mit einer 1:5 Verdünnung begonnen wurde. Untersucht wurden die Liquores von Ratten, die mit D52- und 6/94-Viren intranasal und intracerebral infiziert worden waren und die auch schon für den Mini-Western-Blot Verwendung gefunden hatten (3.2.4.2.5).

Übereinstimmend mit dem Mini-Western-Blot waren nur im Liquor intracerebral mit D52-Virus infizierter Tiere regelmäßig ansteigende IgG-Titer nachweisbar. Hierbei zeigten sich deutliche Signale gegen das NP-Protein, schwächere nur knapp über dem Hintergrundsignal liegende OD₄₀₅-Werte wurden für IgGs gegen das HN- und F-Protein gemessen. Immunglobuline gegen die Proteine P und M konnten nicht nachgewiesen werden. Knapp über dem Hintergrundsignal ließen sich vereinzelt auch für die anderen Infektionsformen IgGs gegen das NP-Protein im Liquor nachweisen. Dieses Ergebnis zeigt nochmals, daß der Mini-Western-Blot, zumindest was die Antikörper gegen das NP-Protein anbelangt, genauso sensitiv ist wie der ELISA.

Die Berechnung des Verhältnisses anti-NP IgG im Liquor zu anti-NP IgG im Serum für die intracerebrale D52-Virus Infektion ergibt am PID 7 einen Wert von 1:250, am PID 22 einen Wert von 1:80. Dies zeigt die im Laufe der Infektion zunehmende Durchlässigkeit der Blut-Gehirnschranke für Immunglobuline, oder aber die zunehmende intrathekale Produktion von virusspezifischen Antikörpern.

Im Gegensatz zu den Serumantikörpern, die schon am PID 7 stark ansteigen, erscheint der Anstieg der IgG-Titer im Liquor verzögert. Die anti-NP Immunglobuline der Klasse G nehmen zwischen dem 12. und 16. Tag nach der Infektion am stärksten zu.



- LIQUOR IGG GEGEN HN-PROTEIN
- ▲—▲ LIQUOR IGG GEGEN F-PROTEIN
- ◇—◇ LIQUOR IGG GEGEN NP-PROTEIN

Abb. 23: Immunglobuline der Klasse G im Liquor von Ratten

ELISA-Titer im Liquor von Ratten, die intracerebral mit 50.000 KID D52-Viren infiziert worden waren. Aufgetragen wurden auf der y-Achse die OD₄₀₅-Werte der 1:5 Liquorverdünnung gegen 300ng gereinigtes Virusprotein, auf der x-Achse die PIDs.

3.2.6.5 Slot-Blot der viralen Proteine HN, NP und F

Warum durch den Mini-Western-Blot Antikörper gegen die Glykoproteine F und HN nicht nachgewiesen werden können, war bis dahin unklar. Die triviale Möglichkeit, daß auf den Western-Blot-Streifen die fraglichen Proteine vielleicht nicht vorhanden waren, konnte durch die India-Ink-Färbung und durch Immuno-Peroxidase-Färbung mit monoklonalen Antikörpern

und antiviralem Gesamtserum ausgeschlossen werden (3.2.4). Die mögliche Verunreinigung der für den ELISA gereinigten Glykoproteine, z.B. mit NP-Protein, die zu einer starken Verfälschung der ELISA-Ergebnisse geführt haben könnte, wurde bereits ausgeschlossen (3.2.6.2).

Ein Faktor, der die Nachweisgrenze für Antikörper gegen die Proteine F und HN im Western-Blot verschlechtert, sind sicherlich die breiteren Banden, die für Glykoproteine zu beobachten sind. Das liegt an dem unterschiedlichen Glykosylierungsgrad und dem damit verbundenen variablen Molekulargewicht der einzelnen Glykoproteine. Beim Antikörperrnachweis binden die Immunglobuline daher auf einer größeren Fläche und verringern dadurch die Sensitivität des Tests. Diese Erklärung allein reicht jedoch nicht aus, um das Fehlen, besonders des F-Proteins, im Western-Blot zu erklären, da im ELISA IgG-Titer gegen dieses Protein gemessen wurden, die ca. 65% des anti-NP Titers erreichten.

Um diese systemabhängigen Unterschiede im Nachweis der Antikörper gegen die Glykoproteine nochmals zu verifizieren, wurde mit den gleichen Chargen gereinigter Proteine, die auch für den ELISA verwendet wurden, ein Slot-Blot mit F, HN und NP durchgeführt. Hierbei wurden die Proteine HN, NP und F, durch die Schlitze einer speziellen Slot-Blot-Apparatur auf Nitrozellulose gesaugt und hier gebunden. So werden definierte Proteinmengen auf eine definierte Fläche aufgetragen. Die proteinbeladene Nitrozellulose wurde dann zum einen mit dem Serum einer infizierten Ratte, zum anderen mit antiviralem Gesamtserum von einem Kaninchen, das mit denaturierten Virusproteinen immunisiert worden war, Immuno-Peroxidase gefärbt (Abb. 24). Die so erhaltenen Signale wurden mit jenen, die im ELISA mit den gleichen Seren gemessen worden waren, verglichen. Das Experiment zeigt deutlich, daß die gleichen Seren, die im ELISA gegen die Proteine HN und F sehr gute Signale liefern, die gleichen Proteine auf Nitrozellulose geblottet nicht erkennen. Das bedeutet, daß ein und dasselbe SDS-denaturierte Protein, von den Serumantikörpern besser erkannt wird, wenn es über Nacht unter physiologischen Pufferbedingungen an eine Polystyrolmatrix gebunden wird, als wenn es relativ schnell, durch Strom oder Unterdruck auf Nitrozellulose transferiert wird.

Das Kaninchenserum erkennt die denaturierte Proteine deswegen sehr gut, weil es mit denaturierten Proteinen immunisiert worden war.

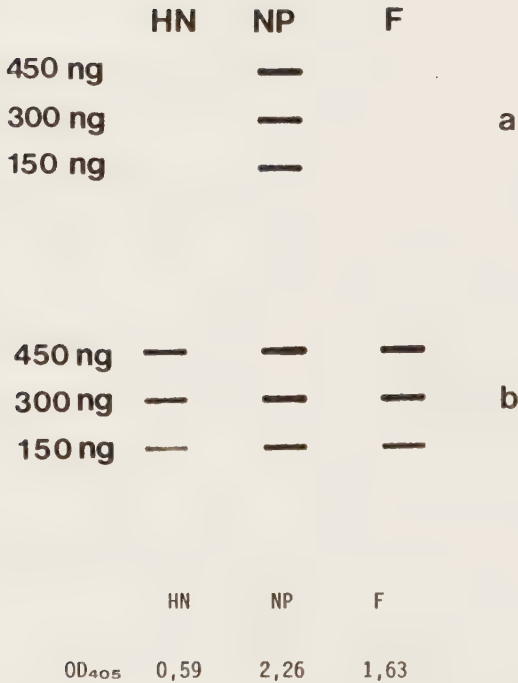


Abb. 24: Slot-Blot gereinigter Virusproteine auf

Nitrozellulose im Vergleich mit dem ELISA

Mittels der Slot-Blot Absaugapparatur wurden gereinigte Virusproteine auf Nitrozellulose gebunden. Es wurden 600ng, 300ng und 150ng von jedem Protein aufgetragen, und die Nitrozellulosestreifen einmal mit 15ul Serum einer Ratte, die vor 22 Tagen intranasal mit 50.000 KID 6/94-Virus infiziert worden war (a) und einmal mit 15ul antiviralem Gesamtserum eines Kaninchens (b) Immuno-Peroxidase gefärbt. Der peroxidasegekoppelte zweite Antikörper (Dakopatts) wurde in beiden Fällen in der Verdünnung von 1:500 verwendet. Unten sind die im ELISA ermittelten OD-Werte angegeben, die mit dem gleichen Rattenserum wie (a) gegen die gleichen gereinigten Proteine gemessen wurden.

3.2.6.6 Vergleich zwischen dem Western-Blot auf Nitrozellulose und Immobilon

Eine weitere Möglichkeit, welche die unterschiedliche Erkennung der Glykoproteine im Mini-Western-Blot und im ELISA zumindest teilweise erklären könnte, sind die Auswirkungen der hydrophoben und hydrophilen Wechselwirkungen zwischen Protein und proteinbindender Membran. Die Glykoproteine sind auf der Zellmembran mittels hydrophober Ankerteile in die Zellmembran eingelagert. Der aus der Zellmembran ragende Teil ist eher hydrophil. Die IgG-Titer, die im Laufe einer Infektion gebildet werden, sind sicherlich hauptsächlich gegen die nativen, hydrophilen Spikeanteile der Glykoproteine gerichtet, da die hydrophoben Membranteile nur schlecht zugänglich sind, und außerdem nur Antikörper gegen Spikeepitope die Virionen neutralisieren können.

Die Nitrozellulose ist eine hydrophile, proteinbindende Membran. Es wäre also denkbar, daß besonders die hydrophilen Epitope der Glykoproteine auf der Membran gebunden werden und daher nicht für die gegen sie gerichteten Antikörper zugänglich sind.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde der Mini-Western-Blot so modifiziert, daß nicht auf Nitrozellulose, sondern auf die hydrophobe Immobilon-Membran geblottet wurde. Auf einer hydrophoben Membran sollten vornehmlich hydrophobe Proteinteile gebunden werden und daher die wichtigeren hydrophilen Epitope freibleiben.

Immobilon muß im Gegensatz zu Nitrozellulose vor Verwendung mit Methanol benetzt und danach im Western-Blot-Puffer ca. 10 Minuten äquilibriert werden. Nach der Blotprozedur ist darauf zu achten, daß die Immobilon-Membran nicht eintrocknet, weil sie sonst nicht mehr benetzbar wäre.

Doch auch nachdem die doppelten Serummenge als erster Antikörper (6ul statt 3ul) verwendet wurde, mit 3%igem Milchpulver in PBS abgesättigt und nur mit PBS (wie im ELISA) gewaschen wurde, konnte kein deutliches Signal gegen das F- und HN-Protein erzielt werden (Abb. 25). Allenfalls das F-Protein ist in den Spuren (e)-(h) schwach erkennbar, wobei es sich bei der auf der Höhe des F-Proteins erscheinenden Bande auch um ein Abbauprodukt vom NP- oder P-Protein handeln könnte. Das Experiment zeigt allerdings eine deutliche Überlegenheit der Immobilonmembran gegenüber der Nitrozellulose was die Auflösung und Schärfe der Proteinbanden be-

trifft. Auch zeigt sich, daß bei der unkonventionellen Verwendung von Milchpulver zum Absättigen der proteinbindenden Membranen das Hintergrundsignal deutlich geringer ausfällt. Die Steigerung der eingesetzten Serummengen auf das doppelte hingegen verbessert die Signalstärke kaum.

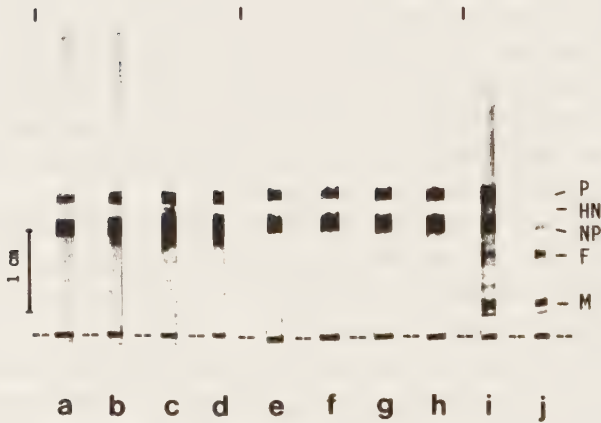


Abb. 25: Vergleich zwischen Nitrozellulose und Immobilon

Streifen (a)-(d) sind Nitrozellulose, Streifen (e)-(j) Immobilon. Auf alle Streifen wurden gleiche Mengen Gesamtvirusprotein geblottet. Die Streifen (a), (b), (e) und (f) wurden mit PBS/BSA abgesättigt, die Streifen (c), (d), (g) und (h) mit Milchpulver, 3%ig in PBS. Streifen (a), (c), (e) und (g) wurden mit 3ul Serum einer mit 6/94-Virus intra-nasal infizierten Ratte Immuno-Peroxidase gefärbt, die Streifen (b), (d), (f) und (h) mit je 6ul desselben Serums. Streifen (i) wurde mit 3ul antiviralem Gesamtserum vom Kaninchen Immuno-Peroxidase, (j) mit India Ink gefärbt. Die gestrichelte Linie gibt die Position des Phenolblau-Markers an.

Erst im nächsten Versuch, nachdem gleiche Proteinmengen von HN, NP und F (50ng/ Spur) aufgetrennt und auf Immobilon geblottet worden waren, konnte zumindest ein Signal gegen F gesehen werden. Für die Immuno-Peroxidase Färbung wurden hier 12ul Serum einer mit 6/94-Viren intranasal infizierten Ratte verwendet (Abb. 26, 5n). Im Vergleich dazu wurden die gleichen Proben auch auf Nitrozellulose geblottet, und beide Membrantypen (Immobilon und Nitrozellulose) auch mit einem antiviralen Gesamtserum vom Kaninchen (je 8ul) Immuno-Peroxidase gefärbt (Abb. 26).

Dieser Versuch zeigt eindeutig den Einfluß der verwendeten proteinbindenden Membranen auf die immunologische Erkennung der Glykoproteine. Immunglobuline, die gegen native Glykoproteine im Laufe einer Infektion gebildet werden erkennen hauptsächlich die hydrophilen Spikeepitope. Daher ist eine hydrophile, proteinbindende Membran schlechter für die Detektion solcher Antikörper geeignet, als eine hydrophobe. Weiterhin zeigte sich auch der Einfluß der unterschiedlichen Proteinmengen, die nach Auftrennung von viralem Gesamtprotein auf die Nitrozellulose oder Immobilon geblottet werden und so die Beurteilung der Antikörpertiter gegen die einzelnen Proteine verfälschen können.

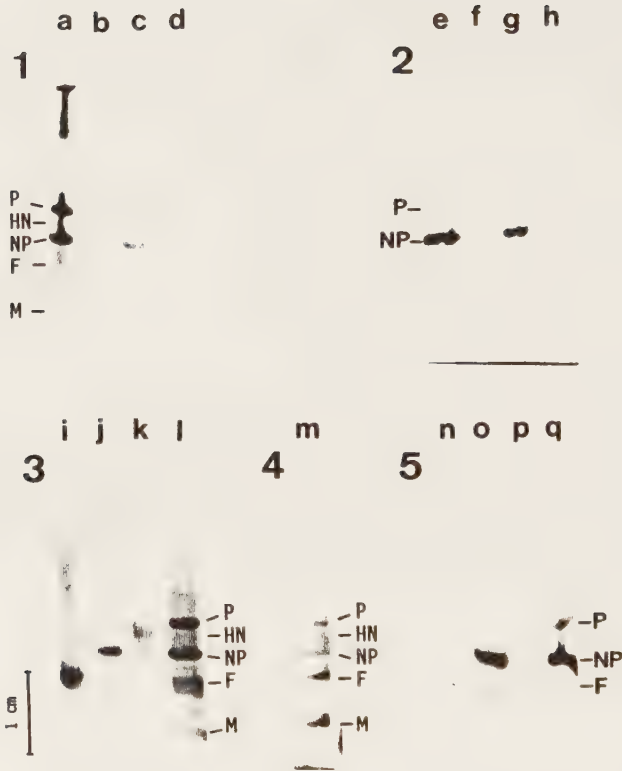


Abb. 26: Vergleich zwischen Mini-Western-Blot auf Nitrozellulose und Immobilon

Die Blots (1) und (2) sind auf Nitrozellulose, (3), (4) und (5) auf Immobilon durchgeführt. (1) und (3) wurden mit 8ul antiviralem Gesamtserum, (2) und (5) mit 12ul Serum einer infizierten Ratte (50.000 KID 6/94-Virus, intranasal) Immuno-Peroxidase gefärbt. In den Spuren (a), (e), (l), (m) und (q) wurde Gesamtvirusprotein aufgetragen, in (b), (f), (k) und (p) je 50ng gereinigtes HN-Protein, in (c), (g), (j) und (o) je 50ng gereinigtes NP-Protein und in den Spuren (d), (h), (i) und (n) je 50ng F-Protein. Der Blot (4) wurde mit India Ink gefärbt.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß der Western-Blot, ein Standardverfahren, nicht in der Lage ist, Antikörper nachzuweisen, die gegen die nativen, im Verlauf einer Infektion auftretenden Glykoproteine gerichtet sind. Diese Tatsache hat offenbar mehrere Ursachen: Das breitere Bandieren von Glykoproteinen, die mögliche Renaturierung der Proteine im ELISA und die Eigenschaften der verwendeten proteinbindenden Membran spielen hier eine Rolle. Um Antikörper gegen alle viralen Proteine zu erfassen erscheint es daher sinnvoll, die Methodik des Western-Blots mit der des ELISAs zu kombinieren. Im ELISA lassen sich Antikörper gegen die Glykoproteine nachweisen, die vom Western-Blot nicht erkannt werden. Hingegen ist der Western-Blot für den Nachweis von anti-P Antikörpern aus unbekannten Gründen etwas sensitiver. Dies zeigt, daß es nicht genügt bestimmte eingeführte Verfahren zu übernehmen und die Ergebnisse weitreichend zu interpretieren, sondern daß auch die Methoden immer wieder kritisch auf ihre Aussagekraft bezüglich der untersuchten Problematik hin überprüft werden müssen.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit sollte die virusproteinspezifische Antikörperantwort im Serum und Liquor Sendaivirus infizierter Mäuse und Ratten untersucht und gleichzeitig der Verlauf dieser Virusinfektion charakterisiert werden. Hierfür war es notwendig eine Technik zu etablieren, die es erlaubt, bei Mäusen und Ratten Liquor zu gewinnen, ohne die Tiere töten zu müssen. Wegen der geringen Liquormengen, die insbesondere aus Mäusen gewonnen werden können, war es weiterhin nötig eine Methode zu erarbeiten, die es ermöglicht, in sehr kleinen Proben-volumina geringe virusspezifische Antikörpertiter festzustellen.

4.1 Die Mini-Western-Blot Methode

Um mit geringem Arbeitsaufwand, sehr schnell und zugleich hochsensitiv Antikörper gegen einzelne virale Proteine im Serum und Liquor nachweisen zu können, wurde die hier vorgestellte Mini-Western-Blot Methode erarbeitet. 6,5%ige Polyacrylamidgele, die nur 0,5mm dick sind, können nur dadurch sicher gehandhabt werden, daß man sie auf eine Trägerfolie aufbringt. Diese ist normalerweise hydrophil, um das Gel gut zu fixieren. Hierbei ist jedoch die Bindung zwischen Gel und Folie so groß, daß das Gel nicht ohne Beschädigung von der Folie getrennt werden kann und die nachfolgende Blotprozedur dadurch unmöglich wird. Erst durch die Verwendung einer hydrophoben Trägerfolie und die Konstruktion einer speziellen Absaugapparatur ist es möglich geworden, niederprozentige und dünne Gele dem Elektrotransfer zugänglich zu machen. Hierdurch werden die Vorteile des Phast-Systems, nämlich Schnelligkeit und automatisierter, immer unter konstanten Bedingungen durchgeführter Gellauf, mit dem Vorteil der immunologischen Erkennung von Proteinen, die der Western-Blot bietet, verbunden. Gleichzeitig versetzt die Methode den Untersucher in die Lage, sehr geringe Mengen virusspezifischer Antikörper zu detektieren. Vergleicht man den Zeitaufwand für den Mini-Western-Blot (Zeitaufwand ca. 5 Std) mit der alternativen ELISA-Technik gegen gereinigte virale Proteine, die zunächst mit der Proteinreinigung, z.B. durch präperative SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese beginnt, über Reinheitsprüfungen schließlich zur klassischen ELISA-Technik (Zeitaufwand insge-

samt mehrere Tage) führt, so erkennt man die enormen Vorteile der Blot-Technik. Es konnte gezeigt werden, daß die Mini-Blot-Technik in der Detektion virusspezifischer Antikörper die gleiche Sensitivität erreicht, wie die ELISA-Technik. In einer 1:500 Verdünnung eines hochtitrigen Serums können noch antivirale Antikörper detektiert werden (3.2.3.3).

Die intensive und kritische Verwendung des Mini-Western-Blots hat weiterhin gezeigt, daß nicht alle Ergebnisse, die diese Methode liefert, allgemeingültig interpretiert werden dürfen: Als problematisch hat sich insbesondere der Nachweis der Antikörper gegen die glykosylierten Proteine F und HN erwiesen. Die Tatsache, daß diese Proteine wegen ihres unterschiedlichen Glykosylierungsgrads sehr breit bandieren, erschwert ihren Nachweis durch elektrophoretische Methoden im allgemeinen. Hinzu kommt, daß Antikörper, die gegen native Glykoproteine gerichtet sind, diese Proteine auf Nitrozellulose geblottet nur schlecht erkennen. Das hat mehrere Ursachen:

Die in vivo primär immunogenen Epitope dieser Proteine können nur die hydrophilen Spikeanteile sein, denn die in der Zellmembran verankerten hydrophoben Proteinteile sind für das Immunsystem nur schlecht zugänglich und daher werden gegen diese Proteinteile sicherlich auch nur wenige Antikörper produziert. Beim Blot der Proteine auf eine hydrophile, proteinbindende Membran, wie Nitrozellulose, werden verstärkt die hydrophilen Epitope der Glykoproteine, gegen welche die meisten Serumantikörper gerichtet sind, auf der Membran gebunden und damit für die nachfolgende Immuno-Peroxidase Färbung unzugänglich. Zumindest für das F-Protein konnte die Relevanz dieses Effekts, durch Vergleich mit der hydrophoben Immobilon-Membran nachgewiesen werden (3.2.6.6).

Zum anderen haben die Proteine im ELISA noch die Möglichkeit, während sie über Nacht an die hydrophob beschichtete Mikrotiterplatte binden, wenigstens in bestimmten Epitopen zu renaturieren. Solche renaturierten Epitope werden von Antikörpern, die gegen native Proteine gerichtet sind, selbstverständlich viel besser erkannt. Im Western-Blot ist eine solche Renaturierung nur schlecht möglich, da die für die Elektrophorese denaturierten Proteine während der Blotprozedur sofort fest an die Membran gebunden und damit zu unbeweglich für eine eventuelle Renaturierung werden. Dieser Unterschied zeigt sich im Vergleich zwischen der ELISA-Technik und dem Slot-Blot auf Nitrozellulose (Abb. 24).

4.2 Infektion und Krankheitsverlauf

Die intranasale Infektion von C-129 Mäusen und Lewis-Ratten mit Sendaiviren, durch Eintropfen der Virussuspension in die Nase, hat immer nur zu sehr milden Krankheitsymptomen geführt. Obwohl D52-Viren in Zellkultur deutlich virulenter sind, bleibt die klinische Symptomatik genauso gering, wie bei Infektionen mit dem temperatursensitiven 6/94-Virus. Damit bestätigen sich Literaturdaten, die behaupten, für schwerwiegende Infektionsverläufe mit Sendaiviren wären Sekundärinfektionen z.B. mit *Pasteurella pneumotropica* (Jakab et al., 1974) oder *Mycoplasma pulmonis* (Cassel et al., 1978) notwendig.

Vergleicht man die intracerebrale 6/94-Virus Infektion von Mäusen mit der von Ratten, so ist anhand der klinischen Symptomatik festzustellen, daß die Lewis-Ratten sehr viel weniger empfindlich sind. Die Ratten zeigen nur für 1-2 Tage geringe Symptome, während die Mäuse erst nach 22 Tagen wieder völlig gesund sind. Da in beiden Fällen mit dem temperatursensitiven 6/94-Virus infiziert worden war und sich die Temperaturen in Mäuse und Rattengehirnen sicherlich nicht deutlich unterscheiden, scheint es sich um eine artspezifisch unterschiedliche Empfänglichkeit der betroffenen ventrikulären Epithelzellen für diesen Virusstamm zu handeln. Dies korreliert mit Literaturdaten, die mit jungen Tieren ermittelt wurden: Die intracerebrale Infektion von säugenden Mäusen mit 6/94-Viren ruft eine nekrotisierende Panenzephalitis und später eine nichtentzündliche Degeneration der weißen Gehirnsubstanz hervor (Rorke et al., 1976, Wolinsky et al., 1976), während bei säugenden Lewis-Ratten nur eine begrenzte Infektion der Meningen und des Plexus chorioideus zu beobachten war. Eine Degeneration der weißen Gehirnsubstanz war bei den Ratten nur selten zu erkennen (Gilden et al., 1978).

Die Untersuchung der gewonnenen Seren konnte in keinem Fall eine Virämie nachweisen. Dies steht im Einklang mit anderen Untersuchern, die nach intranasaler Sendaivirusinfektion in der Milz zwar virale Antigene, aber nie infektiöse Viren nachweisen konnten (Blandford et al., 1971). Auch in anderen Geweben waren nie infektiöse Viren festzustellen (Garlinghouse et al., 1987). Dies schließt jedoch nicht aus, daß es nach besonders hohen Infektionsdosen oder bei immunsupprimierten Wirten doch fakultativ zu einer Virämie kommt und die Viren dadurch ins Gehirn gelangen können. Weitere Möglichkeiten für eine Virusausbreitung ins Ge-

hirn sind die Verschleppung von Nukleokapsiden durch Makrophagen und der sogenannte olfaktorische Weg. Die Sinneszellen im Riechepithel sind die einzigen Nervenzellen, die mit einem Ende, dem sogenannten Riechkolben, mit der Außenwelt in direktem Kontakt stehen und mit ihrem anderen Ende Synapsen mit dem Bulbus olfactorius des ZNS bilden. Nachgewiesen ist dieser Infektionsweg für Rabies und das Westnilvirus (Johnson, 1982). Im ZNS könnten bestimmte Zellpopulationen die Entstehung einer persistierenden oder okulten Infektion fördern. So konnte für Masern-Virus Infektionen gezeigt werden, daß Astrozyten in Zellkultur den gleichen drastischen Abfall der m-RNA Mengen für die Glykoproteine und das Matrixprotein zeigen, der auch in vivo bei Ratten-Infektionen im ZNS feststellbar ist (Ter Meulen, mündliche Mitteilung).

4.3 Antikörper gegen die einzelnen viralen Proteine im Verlauf der Infektion

4.3.1 Zeitlicher Verlauf der Antikörpertiter im Serum

Die schnell und deutlich einsetzende Antikörperantwort zeigt, daß die intranasale Inokulation von D52- und 6/94-Virus bei Mäusen und Ratten am Anfang zu einer akuten Infektion mit einer exponentiellen Steigerung der antigen wirkenden Virusproteine führt. Virusspezifische IgGs sind schon am PID 6 feststellbar, steigen bis zum PID 10-12 exponentiell an, um dann ein Plateau zu erreichen. Der Rückgang der Antikörpertiter erfolgt nur sehr langsam.

Nach intranasaler Infektion von C-129 Mäusen mit D52-Viren verläuft der Antikörpertiter bei allen Tieren ziemlich gleich (Abb. 1). Nach der intranasalen Infektion von C-129 Mäusen mit dem temperatursensitiven 6/94-Virus erreichen ebenfalls alle untersuchten Tiere um den PID 10 herum einen hohen Serumantikörpertiter. Im weiteren Infektionsverlauf ist dann jedoch eine große Variabilität zu erkennen (Abb. 2). Während bei einigen Tieren die virusspezifischen Antikörpertiter wieder schnell zurückgehen, bleiben sie bei anderen nahezu konstant. Dies zeigt sich auch in den Standardabweichungen der gemessenen OD-Werte für die beiden Infektionsformen vom PID 10 bis PID 63 (Abb 1 und 2). Bei der D52-Virus Infektion beträgt diese 0,17, während sie bei der 6/94-Virus Infektion mit 0,41 mehr als doppelt so groß ist. Das deutet darauf hin, daß es

einigen Tieren gelingt die Viren zu eliminieren, während es bei anderen zu einer produktiven Persistenz kommt.

Die Immunantwort der Lewis-Ratten ist nach intranasaler Inokulation der temperatursensitiven 6/94-Viren sogar stärker, als nach intranasaler D52-Virus Infektion. Dies bedeutet, daß für eine Infektion des Respirationstraktes, in dem die Epithelien durch den dauernden Luftzug gekühlt werden, die temperatursensitive Mutation keinen Nachteil für die Virusvermehrung mit sich bringt.

4.3.2 Antikörper gegen das NP-Protein

Im ELISA gegen gereinigte Virusproteine und in der Mini-Western-Blot Technik waren die Titer der Antikörper gegen das NP-Protein am höchsten. Dies ist insofern erstaunlich, als dieses Protein im Inneren des Virions, durch die Virushülle geschützt vorliegt und auch nach Zellinfektion nicht auf der Zelloberfläche erscheint. Eigentlich sollte dieses Protein für das Immunsystem nicht besonders gut zugänglich sein. Andererseits beträgt der Anteil des NP-Proteins mengenmäßig ca. ein Drittel des viralen Gesamtproteins in einem Virion. Eine mögliche Erklärung der hohen anti-NP Titer könnte die Zerstörung virusinfizierter Zellen, durch "natural killer cells" oder immunkompetente zytotoxische T-Zellen sein. Möglicherweise werden dadurch die in diesen Zellen bereits synthetisierten Nukleokapside frei und können, von Makrophagen aufgenommen, in großer Zahl den B-Zellen präsentiert werden.

Es bleibt die Frage offen, ob Antikörper gegen das native NP-Protein in der Lage sind, am Infektionsverlauf etwas zu ändern. Sehr unwahrscheinlich ist, daß sie komplette Virionen neutralisieren, bzw. mit Hilfe des Komplementsystems lysieren können, weil sie keine auf der Virusoberfläche gelegenen Epitope erkennen. Denkbar wären eher immunpathologische Mechanismen, wie z.B. die Ausbildung von Immunkomplexen mit freien Nukleokapsiden aus lysierten Zellen. Solche zirkulierenden Immunkomplexe, bestehend aus Antigen und Antikörpern, werden bei Infektionen von Mäusen mit dem Lymphozytären Choriomeningitis Virus und Retrovirusinfektionen gefunden und lassen sich beim Menschen nach Rubella-, Hepatitis B -, Epstein-Barr- und Zytomegalovirusinfektionen nachweisen (Johnson, 1982). Diese Immunkomplexe können sich entweder an der glomerulären Basalmembran der Nieren, in kleinsten Gefäßen, im Endo-

kard oder auch im Plexus chorioideus des ZNS ablagern. Über nicht inaktivierte Viren, die sich in solchen Immunkomplexen befinden können ist auch eine Infektion des ZNS über den Plexus chorioideus denkbar. Bei der kongenitalen Infektion von Mäusen mit lymphozytärer Choriomeningitis verkürzen immunpathologische Effekte, die unter anderem eine chronische Glomerulonephritis hervorrufen, das Leben der betroffenen Tiere stärker, als die chronisch Infektion des Gehirns oder anderer Organe (Oldstone & Dixon, 1970). Obwohl die Antikörperfraktion gegen das NP-Protein lebenslang persistiert, scheinen solche immunpathologischen Mechanismen bei der Infektion mit Sendaiviren nur eine untergeordnete Rolle zu spielen, da die Lebenserwartung infizierter Tiere offensichtlich nicht herabgesetzt ist. Acht mit 6/94-Viren infizierte Mäuse, deren Lebensspanne beobachtet werden konnte, starben im Alter von weit über zwei Jahren.

Da die Antikörper in hohen Konzentrationen im Serum vorkommen, wäre auch die Bildung von antiidiotypischen Antikörpern gegen die anti-NP-Antikörper möglich. Diese könnten dann wie das NP-Protein selbst eine hohe Affinität zu RNA-Strukturen haben und dadurch Schäden hervorrufen. Beim systemischen Lupus erythematoses werden Autoantikörper gegen DNA und RNA gefunden.

4.3.3 Antikörper gegen das P-Protein

Der Mini-Western-Blot ist in der Detektion von Antikörpern gegen das P-Protein sensitiver als die ELISA-Technik. Die relativ geringen Antikörpertiter, die im ELISA gegen das P-Protein gemessen werden, ergeben im Mini-Western-Blot ein deutliches Signal. Durch beide Techniken ist damit nachgewiesen, daß gegen ein weiteres Protein des Nukleokapsids im Verlauf der Infektion Immunglobuline produziert werden. Die festgestellten Antikörpertiter gegen das P-Protein sind immer ungefähr um den Faktor 10 niedriger als die Immunglobulintiter gegen das NP-Protein. Dieses Verhältnis entspricht dem Verhältnis NP- zu P-Protein im viralen Nukleokapsid (Lamb et al., 1976).

4.3.4 Antikörper gegen das HN- und F-Protein

Es war zunächst sehr überraschend, daß im Western-Blot keine Antikörper gegen die Glykoproteine F und HN festgestellt werden konnten.

Erst durch den ELISA gegen gereinigte Virusproteine konnte die Anwesenheit solcher Antikörper gezeigt werden, die für die Virusneutralisation und für die Zerstörung virusinfizierter Zellen sehr wichtig sind. Nur über Antikörper, die Proteine auf der Virushülle bzw. auf der Oberfläche infizierter Zellen erkennen, kann das Komplementsystem solche Zellen lysieren und können für die Infektion wichtige Epitope blockiert werden. Das bedeutet, daß nur durch Antikörper gegen die Glykoproteine der Virusinfektion wirksam Einhalt geboten werden kann. Es ist durchaus möglich, daß auch der ELISA noch zu geringe Antikörpertiter anzeigt und die wirklichen Titer gegen die nativen Glykoproteine noch höher sind. Andererseits könnten die gemessenen IgG-Titer auch für die Elimination der Viren ausreichend sein. Nachzuweisen wäre die Schutzwirkung bestimmter Antikörpertiter durch Reinfektionsversuche, indem man zeigt, unterhalb welches IgG-Titers die Infektion wieder angeht.

Die im Mini-Western-Blot und ELISA erhaltenen, unterschiedlichen Ergebnisse lassen indirekt Schlüsse darüber zu, gegen welche Epitope der Glykoproteine im Laufe der Infektion Antikörper gebildet werden. Offensichtlich sind die hydrophilen Spikeanteile am stärksten immunogen, was durch die unterschiedliche Erkennung der Proteine nach dem Blot auf die hydrophile Nitrozellulose und hydrophobe Immobilonmembran gezeigt wird (Abb. 26).

4.3.5 Antikörper gegen das M-Protein

Sowohl im ELISA gegen gereinigte Virusproteine, wie auch im Mini-Western-Blot lassen sich keine Antikörper gegen das Matrix-Protein M detektieren. Das läßt den Schluß zu, daß Antikörper gegen dieses Protein während Sendaivirusinfektionen zumindest in so geringen Mengen vorkommen, daß sie unter der Nachweisgrenze der zwei verwendeten, hochsensitiven Methoden liegen. Zwei Möglichkeiten können für die ungenügende Stimulation von B-Zellklonen durch das M-Protein, die zur fehlenden Immunantwort gegen dieses Protein führt, diskutiert werden: Zum einen eine geringe Antigenität dieses Proteins, die daher rühren könnte, daß das M-Protein eine hohe Affinität zu Zellmembranen hat und durch die Einlagerung in körpereigenes Material vom Immunsystem nicht als fremd erkannt wird. Solche Mechanismen werden auch für die ungenügende Immunantwort von Mäusen gegen Coronavirusinfektionen verantwortlich gemacht (Johnson, 1982).

Zum anderen besteht die Möglichkeit, daß das M-Protein dem Immunsystem nicht in ausreichendem Maße zur Verfügung steht. Das Fehlen des M-Proteins ist bei SSPE-Patienten für die Anhäufung von Nukleokapsiden in den Gehirnzellen verantwortlich gemacht worden (Hall & Choppin, 1979). Auch das Fehlen von Antikörpern gegen das M-Protein bei SSPE-Patienten (Hall et al., 1979) bzw. das Vorhandensein nur sehr geringer Titer (Ohara et al., 1985) wurde berichtet. Als Erklärung, warum das M-Protein bei SSPE infizierten Zellen fehlt, wurde seine Instabilität erwähnt (Hall & Choppin, 1981). Die Instabilität des M-Protein in persistent mit Sendaviren infizierten BHK-21 Zellen wurde ebenfalls nachgewiesen (Roux & Waldvogel, 1982). Wenn die rasche Degradation für das Fehlen des M-Proteins in SSPE-Gehirnzellen verantwortlich ist, kann das Autautschen von Viruspartikeln nach Kokultivierung durch die unterschiedliche Enzymausstattung der Indikatorzellen und der humanen Gehirnzellen erklärt werden. Eine schlechtere Inaktivierung des M-Proteins in diesen Zellen würde die Reifung neuer Virionen erlauben. Daß ein solcher Mechanismus auch in vivo bei Sendavirusinfektionen eine Rolle spielen kann, zeigt das Fehlen von Antikörpern gegen das M-Protein.

Das dieser Mechanismus allerdings allein für die Ausbildung einer Persistenz verantwortlich ist, wird dadurch unwahrscheinlich, daß sich in vivo nach intracerebraler und nach intranasaler Sendavirus Infektion in der Immunfluoreszenztechnik keine Anhäufung von Nukleokapsiden wie bei SSPE sichtbar machen läßt. Zum anderen kann das M-Protein in persistent mit Sendaviren infizierten Zellkulturen ungefähr in gleichem Umfang nachgewiesen werden, wie in akut infizierten. Hierbei muß natürlich auch bedacht werden, daß unter Umständen für in vivo Persistenzen ganz andere Mechanismen verantwortlich sein können wie für Zellkulturpersistenzen.

4.4 Dauer der Antikörperproduktion

Sowohl der ELISA, wie auch der Mini-Western-Blot zeigen, daß die antiviralen Antikörpertiter nach der Infektion mit Sendaviren nur sehr langsam zurückgehen. Im ELISA gegen Gesamtprotein (3.2.2) ist zu erkennen, daß nach intranasaler 6/94-Virus Infektion von C-129 Mäusen bei einigen Tieren, über 100 Tage nach der Infektion, der antivirale Antikörpertiter im Serum noch genauso hoch ist, wie um den PID 20. Auch nach

intranasaler D52-Virus Infektion fallen die Antikörpertiter nur äußerst langsam ab. Selbst 736 Tage nach intracerebraler Infektion von Mäusen mit 6/94-Viren sind im Serum eindeutige Antikörpertiter gegen die viralen Proteine P und NP nachzuweisen (3.2.4.1.7). Die Titer sind ungefähr um den Faktor 20-50 niedriger als während der akuten Infektion. Dies spricht für eine andauernde Stimulation des Immunsystems durch eine geringe, persistierende Antigenproduktion. Direkt ließen sich persistierende virale Proteine mit verschiedenen immunologischen Techniken bisher nicht nachweisen (Koch et al., 1984). Unter Ausnutzung des Verstärkungseffekts des Immunsystems lassen sich, durch die andauernde Produktion von antiviralen Antikörpern, zumindest Indizien für eine andauernde Expression viraler Proteine erbringen. Die Sendaivirusinfektion wäre damit in den untersuchten Tiermodellen, nach Durchlaufen der akuten Infektionsphase, nicht als okult, sondern als, wenn auch geringgradig, produktiv persistent zu bezeichnen.

Durch weitere Untersuchungen muß abgeklärt werden, ob mit besseren Methoden nicht doch auf m-RNA- oder Proteinebene die geringe produktive Persistenz von Sendaiviren im Tiermodell direkt nachgewiesen werden kann.

4.5 Virusspezifische Antikörpertiter im Liquor

Aufgrund des beschriebenen Antikörperverhältnisses Blut-Liquor (500:1) sind die nach intranasaler Infektion mit 6/94-Virus bei Ratten bzw. nach intracerebraler 6/94-Virusinfektion bei Mäusen manchmal zu erkennenden virusspezifischen Antikörpertiter im Liquor wahrscheinlich durch die intakte Blut-Liquor-Schranke in den Liquor gelangt. Nur nach intracerebraler Infektion von Ratten mit D52-Viren (Mäuse wurden nicht intracerebral mit D52-Viren infiziert, weil schon nach 6/94-Virus Infektion die klinische Symptomatik sehr ausgeprägt war) kommt es zu einem signifikanten Anstieg der virusspezifischen Antikörpertiter im Liquor. Die im Liquor mittels ELISA und Mini-Western-Blot nachzuweisenden IgGs sind, wie die Serum-IgGs hauptsächlich gegen das NP-Protein gerichtet. Im ELISA ließen sich in der akuten Infektionsphase auch geringe IgG-Titer gegen das F- und HN-Protein nachweisen.

Prinzipiell gibt es drei Möglichkeiten für die Herkunft dieser Immunglobuline im Liquor: Zum einen eine erhöhte Permeabilität der Blut-

Liquor-Schranke. Dadurch würden vermehrt Antikörper aus dem Serum in den Liquor gelangen.

Weiterhin könnten die IgGs intrathekal synthetisiert werden. Hierfür müßten immunkompetente B-Zellen im Laufe der Infektion in das ZNS einwandern.

Die dritte Möglichkeit, eine technisch bedingte Verunreinigung der Liquorproben durch Serum während der Liquorgewinnung, kann dadurch ausgeschlossen werden, daß in Liquorproben von anderen Infektionsarten bei hohen Serumantikörpertitern keine virusspezifischen Antikörper nachzuweisen sind.

Zwischen den ersten genannten Möglichkeiten aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse zu unterscheiden ist nicht eindeutig möglich. Die Tatsache, daß der IgG-Titer im Liquor erst mit einer Verzögerung von 5-6 Tagen eintritt, kann sowohl durch die Tatsache erklärt werden, daß es ungefähr 100 Stunden dauert, bis sich ein Gleichgewicht zwischen der IgG-Konzentration im Serum und im Liquor einstellt (Frick et al., 1958), als auch dadurch, daß es mindestens eine Woche dauert, bis die erst spät im ZNS ankommenden B-Zellen sich zu Plasmazellen ausdifferenziert haben (Johnson, 1982).

Daß eine ausgeprägte intrathekale IgG-Produktion möglich ist, zeigt eindeutig die Tatsache, daß bei einigen persistenten Infektionen des ZNS die virusspezifischen Antikörpertiter im Liquor sogar höher als die im Serum sein können (Griffin et al., 1978). Schäden an der Blut-Liquor-Schranke sind jedoch für intracerebrale Infektionen mit 6/94-Virus ebenfalls nachgewiesen (Simon et al, 1986). Sicherlich wird also ein beträchtlicher Teil der im Liquor auftretenden Antikörper durch die Blut-Liquor-Schranke hindurchdiffundieren, ein anderer Teil kann aber auch intrathekal synthetisiert werden.

Für die intracerebrale Infektion von Mäusen mit 6/94-Viren ist die Ausbildung einer Viruspersistenz im ZNS im Mausmodell bereits nachgewiesen (Koch et al., 1984). Die Antikörpertiter im Liquor nach intracerebraler Infektion mit 6/94-Viren bleiben jedoch sehr gering. Daher ist es unwahrscheinlich, daß virusspezifische Immunglobuline ursächlich an der Entstehung der 6/94-Virus Persistenz beteiligt sind. Auszuschließen ist auch insbesondere die Hypothese, daß im ZNS durch Antikörper gegen die Glykoproteine auf solche Virusmutanten hin selektioniert werden könnte, die nur in geringem Umfang Oberflächenantigene exprimieren, und dadurch dem Immunsystem entgehen können.

4.6. Sendaiviren im Tiermodell

Sendaiviren vermehren sich nach natürlicher intranasaler Infektion hauptsächlich lokal in den primär affinen Organen des Respirationstraktes. Zu einer Generalisation über eine Virämie kommt es höchstens in Ausnahmefällen. Eine klare Abgrenzung zwischen akuter und persistierender Infektion ist aufgrund der fehlenden Virämie und der geringen klinischen Symptomatik nicht möglich. Der Übergang scheint eher fließend zu sein, wobei die von Anfang an geringe Virulenz des Erregers im Laufe der Infektion noch weiter heruntergeregelt wird.

Daß Sendaiviren auch unter natürlichen Bedingungen ins ZNS gelangen können, zeigt die Isolierungsgeschichte des 6/94-Virus aus dem menschlichen Gehirn. Mögliche Infektionsrouten ins Gehirn sind der olfaktorische Weg, aber auch die Infektion von Makrophagen. Über Makrophagen ins Gehirn transportierte Nukleokapside könnten falls sie in empfängliche Zellen gelangen reaktiviert werden und so zu einer Verbreitung im Gehirn führen. Hierbei steht die Frage im Vordergrund, welche Folgen die chronische, intrazelluläre Anwesenheit von Viren oder einzelnen Virusbestandteilen in infizierten Zellen und Geweben haben kann. Es bleibt offen, ob solch eine virale Persistenz in höherentwickelten Organismen eher die Züge der Symbiose, oder des Parasitismus trägt. Ein möglicherweise positiver Aspekt einer solchen Persistenz ist z.B. die Tatsache, daß mononukleäre Leukozyten durch die Behandlung mit Sendaiviren zur Produktion von "tumor necrosis factor" angeregt werden können (Aderka et al., 1986). Auch kann durch Sendaivirus infizierte Leukämiezellen eine Tumoresistenz bei Mäusen induziert werden (Takeyama et al., 1979). Kommt es vielleicht durch persistierende Virusinfektionen zu einer dauernden Stimulation, auch des unspezifischen Abwehrsystems, und so zu einer geringeren Empfänglichkeit für andere Infektionen und Tumorerkrankungen?

Andererseits werden immer wieder persistierende Virusinfektionen für schwere humane Erkrankungen wie SSPE oder MS verantwortlich gemacht oder zumindest diskutiert.

Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Frage, in welchen Zellpopulationen des ZNS die Sendaiviren persistieren. Gibt es vielleicht Zellen, die durch ihre phänotypische Ausprägung die Entstehung von Persistenzen begünstigen? Dies wäre z.B. denkbar über eine teilweise

Blockade der Transkription. Wie bei Masern-Virus Infektionen von Astrozyten könnte eine stark reduzierte Synthese von m-RNAs für die viralen Glykoproteine und das M-Protein eine Persistenz des viralen Replikationskomplexes in speziellen Zellpopulationen des ZNS ermöglichen. Dies zeigt die Bedeutung einer weiteren Untersuchung dieses Tier-Modells, um neue Erkenntnisse über Virus-Wirts-Beziehungen zu gewinnen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollten Serum und Liquor Sendaivirus infizierter Mäuse und Ratten auf virusproteinspezifische Antikörper untersucht werden.

Um solche Untersuchungen durchführen zu können, war es notwendig, eine nichtlethale Liquorpunktionstechnik zu etablieren. Weiterhin mußte eine schnelle, hochsensitive Methode zur Bestimmung proteinspezifischer Antikörper ausgearbeitet werden, um mit geringen Serummengen auszukommen, und um in den kleinen Liquormengen, die aus einer Punktion zur Verfügung stehen, überhaupt spezifische Immunglobuline feststellen zu können. Hierfür wurde eine miniaturisierte Methode auf der Basis des Western-Blots erarbeitet und die Ergebnisse dieser Methode mit einem ELISA gegen gereinigte virale Proteine kritisch überprüft. Dabei stellte sich heraus, daß Antikörper gegen die Glykoproteine im Western-Blot sehr viel schlechter detektiert werden, als im ELISA.

Die Untersuchung der Seren ergab, daß bei jeder verwendeten Infektionsform mit Sendaiviren vom Stamm D52 und 6/94 die Immunantwort gegen das virale NP-Protein, also ein Protein des Nukleokapsids, am stärksten ist. Die Antikörperantwort gegen das F-, das HN- und das P-Protein fiel in der angegebenen Reihenfolge schwächer aus. Gegen das Matrixprotein M waren keine Antikörper nachweisbar.

Viruspezifische Antikörper im Liquor waren nur nach intracerebraler Infektion der Tiere feststellbar. Bei den Mäusen konnten nach 6/94-Virus Infektion geringe Antikörpertiter gegen das virale NP-Protein im Liquor festgestellt werden. Die Lewis-Ratten zeigten nach Infektion mit Sendaiviren vom Stamm D52 ein deutliches Ansteigen der virusspezifischen Antikörper im Liquor cerebrospinalis. Diese Antikörper waren ebenfalls gegen das NP-Protein gerichtet.

SUMMARY

Characterization of Antibodies in the Cerebrospinal Fluid and the Serum of Rats and Mice infected with Sendai virus.

In this work serum and cerebrospinal fluid (CSF) of Sendai virus infected mice and rats were examined for virus protein specific antibodies. To carry out these examinations, it was necessary to establish a nonlethal technique for gaining liquor cerebrospinalis. Furthermore a fast and highly sensitive method had to be worked out, which only needs a little amount of serum. This method also had to be able to detect specific immunoglobulins in little amounts of liquor. For this purpose a miniaturized method based on Western-blotting was established and the results of this method were critically checked by an ELISA against purified viral proteins. In the course of the inquiry it appeared that the Western-blot detects antibodies against the glycoproteins worse than the ELISA technique.

The examination of the sera proved, that for all forms of infections with Sendai virus (strain D52 and 6/94) the immuneresponse against the viral NP-protein, a protein of the nucleocapsid, was the strongest. The antibody response against the F-, the HN- and the P-protein was in the stated row lower. No antibodies were detected against the M-protein.

Virus-specific antibodies in the CSF were only after intracerebral infection detectable. After 6/94-virus infection of mice very low antibody titers against the viral NP-protein were measured in the CSF. The Lewis-rats showed only after intracerebral infection with the Sendai virus strain D52 a significant rise of the virus-specific antibody titers in the CSF. These antibodies were also directed against the viral NP-protein.

6. LITERATUR

Alexander, D.J. (1980) Avian paramyxoviruses. *Vet.Bull.* 50:737.

Appel, M.J., Percy, D.H. (1970) SV 5-like parainfluenza virus in dogs. *J. Am. Vet. Med. Ass.* 156:1778.

Bachmann, P.A., Gedeck, B., Mahnel, H., Mayr, A., Schels, H. (1984) *Medizinische Mikrobiologie, Infektions und Seuchenlehre*. Enke Verlag, Stuttgart.

Besch, P.K. (1975) *Clinical radioassay procedures: A compendium*. American association of clinical chemists, Washington, D.C.

Bennett, J.C. (1985) The etiology of rheumatoid arthritis. In: Kelley, W.N., Harris, E.D., Rudy, S., Sledge, C.B., eds. *Textbook of rheumatology*. W.B. Saunders, Philadelphia.

Blandford, G., Cureton, R.S.R., Heath, B. (1971) Studies on the immune-response in Sendai infection of mice. *J. Med. Microbiol.* 4:351-357.

Bogen, C., Gilden, D.H., Wrobleska, Z., Wolinsky, J.S. (1977) Experimental infection of human leucocytes with parainfluenza 1 (6/94) virus. *Infect. Immun.* 18:501-508.

Brody, J.A. (1972) Multiple Sclerosis. 127-142. Academic Press, New York-London.

Brüssow, H. (1983) Versuche zum Mechanismus der viralen Persistenz in Zellen am Beispiel des Paramyxovirus 6/94. Doktorarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität, München

Burns, W.H. (1975) Viral Antigens. In: *Viral Immunology and Immunopathologie*, ed by A.L. Notkins, 43-56. Academic Press, New York

Cassell, G.H., Lindsey, J.R., Baker, H.J. (1979) Mycoplasmal and Rickettsial Diseases. In: Baker, J.H., Lindsey, J.R., Weisbroth, S.H., The Laboratory Rat, Vol. 1., 243-269. Academic Press, New York.

Chanock, M. & Johnson, K.M. (1964) Parainfluenza viruses. In: Diagnostic procedures for viral and rickettsial diseases. American Public Health Association, New York, pp. 470-486.

Chanock, R.M., Kapkian, A.Z., Mills, J., Kim, W.H., Parrott, R.H. (1970) Influence of immunological factors in respiratory syncytial virus disease. Arch. environm. Hlth. 21:347.

Chou, S.M., Ross, R., Burrell, R., Gutmann, L., Harley, J.B. (1973) Subacute focal adenovirus encephalitis. J. Neuropathol. Exp. Neurol. 32:34-49.

Cole, G.A., Gilden, D.H., Monjan, A.A., Nathanson, N. (1971) Lymphocytic choriomeningitis virus: Pathogenesis of acute central nervous system disease. Fed. Proc. 30:1831-1841.

Dörries, R., ter Meulen, V. (1984) Detection and identification of virus-specific, oligoclonal IgG in unconcentrated cerebrospinal fluid by immunoblot technique. J. Neuroimmunol. 7:77-89.

Dorfman, L.J. (1973) Cytomegalovirus encephalitis in adults. Neurology (Minneap.) 23:136-144.

Dubios-Dalq, M., Holmes, K.V., Rentier, B. (1984) Assembly of enveloped RNA Viruses. Springer-Verlag, Wien.

Emerson, S.U. (1985) Rhabdoviruses. In: Virology, Ed by B.N. Fields, Raven Press, New York.

Engvall, E. & Perlmann, P. (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): quantitative assay of immunoglobulin G. Immunochemistry. 8:871.

Etkind, P.R., Cross, R.K., Lamb, R.A., Merz, D.C., Choppin, P.W. (1980) In vitro synthesis of structural and nonstructural proteins of Sendai and SV5 viruses. *Virology* **100**:22-33.

Frick, E. & Scheid-Seydel, L. (1958) Untersuchungen mit J^{131} -markiertem Globulin zur Frage der Abstammung der Liquoreiweißkörper. *Klin. Wochenschr.* **36**:857-863.

Friedman, R.M. & Ramseur, J.M. (1979) Mechanism of persistent infections by cytopathic viruses in tissue culture. *Arch. Virol.* **60**:83-103.

Fujinami, R.S. & Oldstone, M.B.A. (1979) Antiviral antibody reacting on the plasmamembrane alters measles virus expression inside the cell. *Nature* **279**:529-530.

Fujinami, R.S. & Oldstone, M.B.A. (1980) Alterations in expression of Measles virus polypeptides by antibody: molecular events in antibody-induced antigenic modulation. *J. Immunol.* **125**:78-85.

Fujinami, R.S. & Oldstone, M.B.A. (1983a) Antigenic modulation: A mechanism of viral persistence. In: *Immunology of nervous system infections*. In: *Progress in brain research*, Vol.59:105-111, Elsevier Science Publishers B.V.

Fujinami, R.S., Oldstone, M.B.A., Wroblewski, Z., Frankel, M.E., Koprowski, H. (1983b) Molecular mimicry in virus infection: cross-reaction of measles virus phosphoprotein or of herpes simplex virus protein with human intermediate filaments. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**:2346-2350.

Garlinghouse, L.E., Van Hoosier, G.L., Giddens, W.E. (1987) Experimental Sendai virus infection in laboratory rats. I. Virus replication and Immuneresponse. *Lab. Anim. Sci.* **37**:437-441.

Gerhard, W., Iwasaki, Y., Koprowski, H. (1978) The central nervous system-associated immune response to parainfluenza type I virus in mice. *J. Immunol.* **120**:1256-1260.

Giddens, W.E., Van Hoosier, G.L., Garlinghouse, L.E. (1987) Experimental Sendai virus infection in laboratory rats. II. Pathologie and immunochemistry. *Lab. Anim. Sci.* **37**:442-448.

Georges, J.C. (1981) Les fonctions biologique des differents polypeptides constitutifs des paramyxovirus. *Bull. Inst. Pasteur* **79**:3-78.

Gibbs, E.P., Taylor, W.P., Lawman, M.J.P., Bryant, J. (1979) Classification of peste de petits ruminants virus as the fourth member of the genus morbillivirus. *Intervirology*. **11**:268.

Gilden, D.M.D., Rorke, L.B.M.D., Wrobleska, Z.M.D., Wellish, M.B.S. (1978) Parainfluenza 1 (6/94) virus-induced white matter degeneration: Enhancement by adoptive transfer of virus-sensitized immunocytes. *Neurology* **28**:1004-1007.

Gocke, D.J. (1975) Extrahepatic manifestations of viral hepatitis. *Am. J. Med. Sci.* **270**:49-52.

Griffin, D.E. & Johnson, R.T. (1977) Role of the immune response in recovery from Sindbis virus encephalitis in mice. *J. Immunol.* **118**:1070-1075.

Griffin, D.E., Narayan, O., Bukowski, J., Adams, J., Cohen, S.R. (1978) The cerebrospinal fluid in visna, a slow virus disease of sheep. *Ann. Neurol.* **4**:212-218.

Haire, M. (1977) Significance of virus antibodies. *Br. Med. Bull.* **33**:40-44.

Hall, W.W. & Chopin, P.W. (1979) Evidence for lack of synthesis of M polypeptide of measles virus in brain cells in subacute sclerosing panencephalitis. *Virology* **99**:443-447.

- Hall, W.W., Lamb, A.L., Choppin, P.W. (1979) Measles and subacute sclerosing panencephalitis virus proteins: lack of antibodies to the M protein in patients with subacute sclerosing panencephalitis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **76**:2047-2051.
- Hall, W.W. & Choppin, P.W. (1981) Measles virus proteins in the brain tissue of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *N. Engl. J. Med.* **304**:1152-1154.
- Hamaguchi, M., Yoshida, T., Nishikawa, K., Naruse, H., Nagai, Y. (1983) Transcriptive complex of Newcastle Disease Virus. I. Both L and P proteins are required to constitute an active complex. *Virol.* **128**: 105-117.
- Heggeness, M. H., Scheid, A., Choppin, P.W. (1981) The relationship of conformational changes in the Sendai virus nucleocapsid to proteolytic cleavage of the NP polypeptide. *Virol.* **114**: 555-562.
- Heukeshoven, J. & Dernick, R. (1985) Simplified method for silver staining of proteins in polyacrylamide gels and the mechanism of silver staining. *Electrophoresis* **6**:103-112.
- Hightower, L.W. & Bratt, M.A. (1974) Protein synthesis in Newcastle disease virus-infected chick embryo cells. *J.Virol.* **13**:788-800.
- Imagawa, D.T. (1968) Relationships among measles, canine distemper and rinderpest viruses. *Prog. Med. Virol.* **10**:160.
- Ito, J., Yamamoto, F., Takano, M., Maeno, K., Shimokata, K., Iinuma, M., Hara, K., Iijima, S. (1983) Detection of cellular receptors for Sendai virus in mouse tissue sections. *Arch. Virol.* **75**:103-113.
- Jackson, G.G., Muldon, R.L. (1973) Viruses causing common respiratory infections in man. II. Enteroviruses and paramyxoviruses. *J. Inf. Dis.* **128**:387.
- Jakab, G. (1974) Effect of sequential inoculations of Sendai virus and *Pasteurella pneumotropica* in mice. *Am. Vet. Med. Assoc.* **164**:723-728.

Jahnke, U., Fischer, E.H., Alvord, E.C. (1985) Sequence homology between certain virus proteins and proteins related to encephalomyelitis and neuritis. *Science* **229**:282-284.

Johnson, R.T. (1982) Viral infections of the central nervous system. Raven Press, New York.

Jubelt, B., Gallez-Hawkins, G., Narayan, O., Johnson, R.T. (1980) Pathogenesis of human poilovirus infection in mice. I. Clinical and pathological studies. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **39**:138-148.

Karcher, D., Lowenthal, A., Thormann, H., Noppe, M. (1981) Serological identification of viral antigens after electrophoretic transfer. *J. Immunol. Methods.* **43**:175.

Kimura, Y., Shimokata, K., Nishiyama, Y., Nagata, I., Kitoh, J. (1975) Temperature-sensitive virus derived from BHK cells persistently infected with HVJ (Sendai virus). *J. Virol.* **15**:55-63.

Kimura, Y., Örvell, C., Norby, E. (1979) Assembly of viral structural proteins in cells infected with a temperature sensitive mutant derived from an HVJ (Sendai virus) carrier culture. *Arch. Virol.* **61**:163-168.

Kingsbury, D.W. & Portner, A. (1970) On genesis of incomplete Sendai virions. *Virology* **42**:872-879.

Kingsbury, D.W., Portner, A., Darlington, R.W. (1970) Properties of incomplete Sendai virions and subgenomic viral RNAs. *Virology* **42**:857-871.

Kingsbury, D.W., Bratt, M.A., Choppin, P.W., Hanson, R.P., Osaka, Y., Ter Meulen, V., Norrby, E., Plowright, W., Rott, R., Wunner, W.H. (1978) Paramyxoviridae. *Interviol.* **10**:137-152.

- Koch, E.M., Neubert, W.J., Hofschneider, P.H. (1984) Lifelong persistence of paramyxovirus Sendai 6/94 in C129 mice: detection of latent viral RNA by hybridisation with a cloned genomic cDNA probe. *Virology* **136**:78-88.
- Krakowka, S., Wallace, A.L., Koestner, A. (1981) Shared antigenetic determinants between brain and Thymus-derived lymphocytes in dogs: implications regarding the significance of antimyelin antibodies in demyelination. *Acta Neuropathol.* **54**:75.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lamb, R.A., Mahy, B.W.J., Choppin, P.W. (1976) The synthesis of Sendai virus polypeptides in infected cells. *Virology* **69**:116-131.
- Lamb, R.A. & Choppin, P.W. (1978) Determination by peptide mapping of the unique polypeptides in Sendai virions and infected cells. *Virol.* **84**:469-478.
- Lancaster, J.E. (1973) Newcastle disease - modes of spread. *Vet. Bull.* **43**:221
- Lewandowski, L.J., Lief, F.S., Verini, M.A., Pienowski, M., ter Meulen, V., Koprowski, H. (1974) Analysis of a viral agent isolated from multiple sclerosis brain tissue. *J. Virol.* **13**:1037-1045.
- Lewandowski, L.J., Gerhard, W.J., Palmer, .C. (1975) Cell-mediated cytotoxicity against murine cells infected with 6/94-virus, a para-influenza type 1 isolate from multiple sclerosis brain tissue. *Infection and Immunity* **13**:712-721.
- Lief, F.S., Loh, W., ter Meulen, V., Koporowski, H. (1975) Antigenic variation among parainfluenza type 1 (Sendai) viruses: Analysis of 6/94 virus. *Intervirology* **5**:1-9.

Lipton, H.L. & Gonzalez-Scarano, F. (1978) Central nervous system immunity in mice infected with Theiler's virus. I. Local neutralizing antibody response. *J. Infect. Dis.* **137**:145-151.

Mary, B.M., John, G.N., Michael, E.L. (1987) Immunglobulin A monoclonal Antibodies protect against Sendai virus. *J. Virol.* **61**:2624-2626.

Mandel, B. (1983) Interaction of viruses with neutralising antibodies. In: Fraenkel-Contrat, H., Wagner, R.R.: *Comprehensive Virology*. Vol. 15, Plenum Press, New York.

McCormick, W.F., Rodnitzky, R.L., Schochet, S.S., McKee, P. (1969) Varicella-zoster encephalomyelitis. *Arch. Neurol.* **21**:559-570.

McFarland, H.F. (1974) In vitro studies of cell-mediated immunity in an acute viral infection. *J. Immunol.* **113**:173-180.

McMichael, A.J., Gotch, F., Noble, G.R. (1983) Cytotoxic T Cell Immunity to Influenza. *New Engl. J. Med.* **309**:13.

Mehta, P.D., Mehta, S.P. (1987) Quantitation of IgG and albumin in CSF and serum from multiple sclerosis patients by enzyme-linked immunosorbent assay. *Acta Neurol. Scand.* **75**:125-129.

Mims, C.A., Cuzner, M.L., Kelly, R.E. (1983) Viruses and demyelinating diseases. Academic Press, London.

Morgan, E.M., Re, G.G., Kingsbury, D.W. (1984) Complete sequence of the Sendai virus NP gene from a cloned insert. *Virol.* **135**:279-287.

Nagai, Y., Ogura, H., Klenk, H.D. (1976) Studies on the assembly of the Envelop of Newcastle disease virus. *Virol.* **69**:523-538.

Neubert, W.J. & Hofschneider, P.H. (1983) Transient rescue of Sendai-6/94 cl virus from the persistently infected cell line Cl-E-8 by cocultivation. *Virol.* **125**:445-453.

Nerenberg, S.T. & Prasad, R. (1975) Development and clinical application of radioimmunoassay techniques for measuring low levels of immunoglobulin classes G, A, M, D, and E in cerebrospinal and other bodyfluids. *J. Lab. Clin. Med.* **86**:887.

Nordal, W. J. , Vandvik, B., Norrby, E. (1978) Demonstration of electrophoretically restricted virus specific antibodies in serum and CSF by imprint electro immunofixation. *Scand. J.Immunol.* **7**:381-388.

Notkins, A.L., Onodera, T., Prabhakar, B. (1984) Virus induced autoimmunity. In: Notkins, A.L., Oldstone, M.B.A., eds. *Concepts in viral pathogenesis*. Springer-Verlag, New York.

Örvell, C. & Grandien, M. (1982) The effects of monoclonal antibodies on biologic activities of structural proteins of Sendai virus. *J. Immunol.* **129**:2779-2787.

Ogura, H., Sato, H., Hatano, M. (1981) Temperature sensitive HVJ (Sendai Virus) with altered P polypeptide derived from persistently infected cell lines. *J. Gen. Virol.* **55**:469-473.

Ohara, Y., Tashiro, M., Takase, S., Homma, M. (1985) Detection of antibody to M protein of measles virus in patients with subacute sclerosing panencephalitis: A comparative study on immunoprecipitation. *Microbiol. Immunol.* **29**:709-723.

Roitt, I.M., (1984) *Essential Immunology*, 5th edition Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Rorke, L.B., Gilden, D.H., Wrobleska, Z., Wolinsky, J.S. (1976) Experimental panencephalitis induced in suckling mice by parainfluenza type 1 (6/94) virus. *J. Neuropath. Exp. Neur.* **35**:247-258.

Roux, L. & Holland, J.J. (1979) Role of defective interfering particles of Sendai virus in persistent infections. *Virology*. **93**:91-103.

Roux, L. & Waldvogel, F.A. (1981) Establishment of Sendai virus persistent infection: biochemical analysis of the early phase of a standard plus defective interfering virus infection of BHK cells. *Viol.* **112**:400-410.

Roux, L. & Waldvogel, F.A. (1982) Instability of the viral M protein in BHK-21 cells persistently infected with Sendai virus. *Cell* **28**:293-302.

Schaffner, W. & Weissmann, C. (1973) A rapid, sensitive and specific method for the determination of protein in dilute solution. *Anal. Biochem.* **56**: 502-514.

Scheid, A. & Choppin, P.W. (1974) Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of fusion, hemolysis and infectivity by proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Viol.* **57**:475-490.

Scheid, A. & Choppin, P.W. (1977) Two disulfide-linked polypeptide chains constitute the active F protein of paramyxoviruses. *Viol.* **80**:54-66.

Scheid, A., Graves, M.C., Silver, S.M., Choppin, P.W. (1978) Studies on the structure and functions of paramyxovirus glycoproteins. In: *Negative strand viruses and the host cell* Academic Press, London. pp. 181-193.

Schuller, E. & Thömpe, L. (1973) Determination of IgG heavy chains by electro immuno diffusion in the nanogramm range: simultaneous application to serum and CSF of neurological patients. *Clinica Chimica Acta.* **44**:287-294.

Sehgal, P.B., Pfeffer, L.M., Tamm, I. (1982) Interferon and its inducers. In Came, P.E., Caliguiri, A.: *Chemotherapy of viral infections*. Springer, Berlin.

Sever, J.L., South, M.A., Shaver, K.A. (1985) Delayed manifestations of congenital rubella. *Rev. Infect. Dis.* **7**:164-169.

Sigurdsson, B. (1954) Risa, a chronic encephalitis of sheep. With general remarks on infections which develop slowly and some of their special characteristics. *Br. Vet. J.* **110**:341-354.

Simon, J. (1986) Pathogenese der Multiplen Sklerose: Die Rolle des Virus aus der Sicht neuer experimenteller und klinischer Befunde. *Münch. med. Wschr.* **128**:62-66.

Simpson, R.W., McGinty, L., Simon, L., Smith, C.A., Godzeski, C.W., Body, R.J. (1984) Association of parvoviruses with rheumatoid arthritis of humans. *Science* **223**:1425-1428

Skoldenberg, B., Kalimo, K., Carstrom, A., Forsgren, M., Halonen, P. (1981) Herpes simplex encephalitis: A serological follow-up study. *Acta Neurol. Scand.* **63**:273-285.

Stewart, G.J., Kirk, R.L. In: Hallpike J.F., Adams C.L.W.M., Tourtelotte W.W. (1983) Multiple Sclerosis. Pathology, diagnosis and managment. 97-128. Chapman and Hall, London.

Takeyama, H., Kawashima, K., Yamada, K., Ito, Y. (1979) Induction of tumor resistance in mice by L1210 leukemia cells persistently infected with HVJ (Sendai virus). *Gann* **70**:493-501.

Ter Meulen, V., Koprowsky, H., Iwasaki, Y., Kaechell, Y.M., Mueller, D. (1972) Fusion of cultured multiple sclerosis brain cells with indicator cells. Presence of nucleocapsids and virions and isolation of para-influenza type virus. *Lancet* **2**:1-5.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:4350-4354.

Tyrrel, D.A.J., Coid, C.R. (1970) Sendai virus infections of rats as a convenient model of acute respiratory infection. *Vet. Rec.* **86**:164-165.

Vandvik, B. & Degre, M. (1975) Measle virus antibodies in serum and CSF in patients with Multiple Sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 24:201-219.

Vandvik, B. (1977) Oligoclonal IgG and free light chains in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and infectious diseases of the central nervous system. *Scand. J. Immunol.* 6:913-922.

Vandvik, B., Norrby, E., Stenn-Johnson, J., Stensvold, K. (1978) Mumps meningitis: Prolonged pleocytosis and occurrence of mumps virus-specific oligoklonal IgG in the cerebrospinal fluid. *Eur. Neurol.* 17:13-22.

Verini, M.A. & Lief, F.S. (1979) Interaction between 6/94 Virus, a parainfluenza type 1 strain, and mouse macrophages. *Infect. Immun.* 24:720-728.

Willenbrink, W. (1987) Herstellung von monoklonalen Antikörpern zum Nachweis struktureller Veränderungen von Sendavirus Proteinen aus persistent infizierten Zellen. Diplomarbeit. Ludwig-Maximilians-Universität, München.

Wolinsky, J.S., Gilden, D.H., Rorke, L.B. (1976) Experimental panencephalitis induced in suckling mice by parainfluenza 1 (6/94) virus. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 35:271-286.

Wolinsky, J.S. (1978) Progressive rubella panencephalitis. In: *Handbook of Clinical Neurology*, Vol 34, ed. by .J. Vinken & G.W. Bruyn, 331-341. Elsevier, North-Holland/ Amsterdam.

Wolinsky, J.S., Stroop, W.G. (1978) Virulence and persistence of three prototype strains of mumps virus in newborn hamsters. *Arch. Virol.* 57:355-359.

Yates, W.D.G. (1982) A review of infectious bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can. J. Comp. Med.* 46:225

Yoshida, T., Nagai, Y., Maeno, K., Iinuma, M., Hamagushi, M., Matsumoto, T., Nagajoshi, S., Hoshino, M. (1979) Studies on the role of M protein in virus assembly using a ts mutant of HVJ (Sendai virus). *Virol.* **92**:139-154.

Yoshida, T., Nagai, Y., Yoshii, S., Maeno, K., Matsumoto, T., Hoshino, T. (1976) Membrane (M) protein of HVJ (Sendai virus): its role in virus assembly. *Virol.* **71**:143-161.

Yoshida, T., Hamagushi, M., Naruse, H., Nagai, Y. (1982) Persistent infection by a temperature sensitive mutant isolated from a Sendai virus (HVJ) carrier culture: its initiation and maintenance without aid of defective interfering particles. *Virol.* **120**:329-339.

Zgorniak-Nowosielska, I.M.D., Iwasaki, Y.M.D., Tachovsky, P.D., Tanaka, R.M.D., Koprowski, H.M.D. (1976) Experimental Parainfluenza type 1 virus-induced encephalopathy in adult mice. *Arch. Neurol.* **33**:55-62.

7. ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
ABTS	2,2'-Azino-di-(3-ethyl-benz-thiazol-6-sulfonsäure)
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
DAB	Diaminobenzidin
DI-Partikel	Defekte interferierende Partikel
D52-Virus	Sendaivirus vom Stamm D52
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
F, F ₁ , F ₂	Fusionsprotein
HA-Test	Hämagglutinationstest
HAD-Test	HämadSORPTIONstest
HN	Hämagglutinin-Neuraminidase-Protein
IgA	Immunglobulin der Klasse A
IgD	Immunglobulin der Klasse D
IgE	Immunglobulin der Klasse E
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IgM	Immunglobulin der Klasse M
i.c.	intracerebral
i.m.	intramuskulär
i.n.	intranasal
i.v.	intravenös
kD	Kilodalton
kb	Kilobasenpaare
KID-Test	Kulturinfektionsdosistest
M	Matrixprotein
ug	Mikrogramm
ul	Mikroliter
ml	Milliliter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
ng	Nanogramm
MS	Multiple Sklerose
NP	Nukleoprotein
OD	optische Dichte

OD ₄₀₅	optische Dichte bei 405nm
P	Polymeraseprotein
PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PID	Postinfection day
RIA	Radio-immuno-assay
rpm	Umdrehungen pro Minute
6/94-Virus	Sendaivirus vom Stamm 6/94
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSPE	Subakute sklerotisierende Panenzephalitis
TCA	Trichloressigsäure
WT	Wildtyp

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie (Martinsried bei München) in der Abteilung für Virusforschung unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Hofschneider durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Dr. Peter Hans Hofschneider danke ich für den Arbeitsplatz, Mittel und Unterstützung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Dr.h.c.mult. Anton Mayr danke ich für die Vertretung der Arbeit vor der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität in München.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Wolfgang Neubert für die vielen hilfreichen Ratschläge und die stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Dr. R. Dörries danke ich für seine Hilfe beim Erlernen der Liquorpunktionstechnik.

Lebenslauf

Michael Sigmund

29.7.1960	geboren in München
1966-1969	Grundschule in Gilching bei München
1969-1970	Grundschule in Germering bei München
1970-1980	Gymnasium in Germering
1980	Abitur
1980-1981	Wehrdienst
1981-1986	Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München.
November 1986	Staatsexamen
März 1987- April 1988	Dissertationsarbeit in der Abteilung für Virusforschung am Max-Planck-Institut für Biochemie unter der Leitung von Prof. Dr. Dr Peter Hans Hofschneider.

